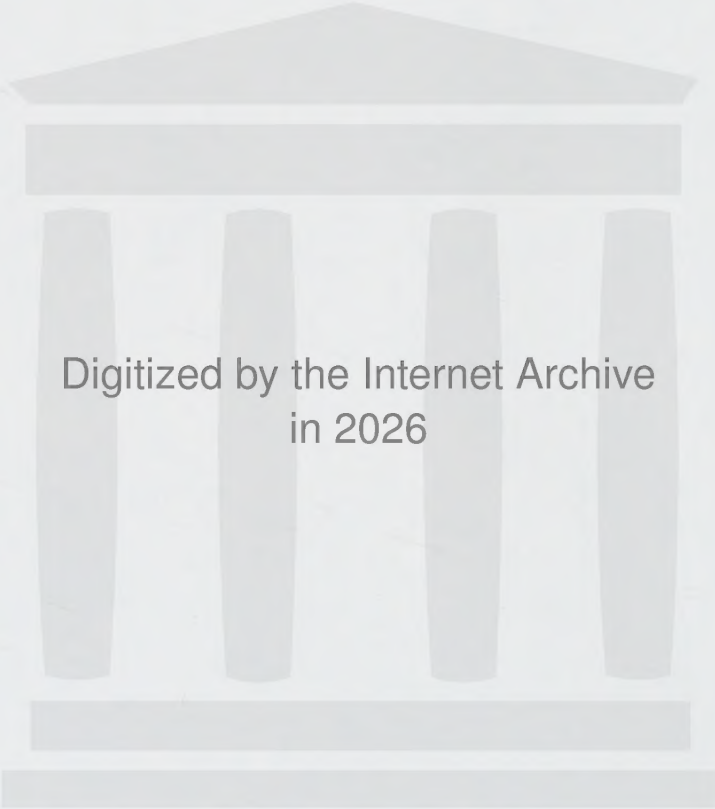


**Zur Rolle des Phospholipidstoffwechsels
bei der Übertragung des Insulinsignals
vom Rezeptor in die Zelle**

Johann Baptist Gallwitz



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0044

Aus dem
Institut für klinische Chemie
und der Forschergruppe Diabetes
des Krankenhauses München Schwabing
der Universität München

Vorstand Prof. Dr. O. H. Wieland

Zur Rolle des Phospholipidstoffwechsels bei der
Übertragung des Insulinsignals vom Rezeptor in die Zelle

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johann Baptist Gallwitz
aus
Karlsruhe
München 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O. H. Wieland

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert
Prof. Dr. H.-G. Zachau

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. B. Köpfer-Hobelsberger

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.1986

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Diabetesforschung am Krankenhaus München Schwabing unter der Leitung von Prof. Dr. O. H. Wieland durchgeführt.

Herzlich danken möchte ich besonders:

Herrn Prof. Dr. O. H. Wieland für die Überlassung des Themas, für die guten Arbeitsbedingungen, die Ermöglichung dieser Arbeit und seine intensive Unterstützung und stete Förderung derselben.

Frau Dr. B. Köpfer-Hobelsberger für das rege Interesse an dieser Arbeit, ihre Anleitung und hilfsbereite Unterstützung.

Herrn Dr. F. Machicao für das mir entgegengebrachte Wohlwollen und für zahlreiche anregende Diskussionen, die den Fortschritt der Arbeit entscheidend beeinflußt haben.

Frau P. Drexler und Frau M. Häusler für ihre wertvollen technischen Ratschläge

allen Mitarbeitern der Forschergruppe Diabetes für die freundschaftliche Hilfsbereitschaft.

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Aatase	Arylamin-Acetyl-transferase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Albumin aus Rinderserum
cAMP	cyclisches Adenosin-3'-5'-monophosphat
CDP	Cytosin-5'-diphosphat
CoA	Coenzym-A
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
DAG	Diacylglycerin
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
EGTA	Bis-(aminoethyl)-glykolether-N,N,N',N'-tetraessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
IP	Inositphosphat
IP ₂	Inositdiphosphat
IP ₃	Inosittriphosphat
LDH	Lactatdehydrogenase
MET	Mercaptoethanol
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
PDBU	4- β -phorbol-12,13-dibutyrat
4- α -PDD	4- α -phorbol-12,13-didecanoat
4- β -PDD	4- β -phorbol-12,13-didecanoat
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PI	Phosphatidylinosit
PIP	Phosphatidylinositphosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositbisphosphat
pNA	para-Nitroanilin
TCA	Trichloressigsäure
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol
TPP	Tyraminpyrophosphat
TRAM	Triethanolamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIALIEN UND METHODEN	12
2.1. MATERIALIEN	12
2.1.1. Chemikalien	12
2.1.2. Geräte	13
2.1.3. Versuchstiere	14
2.2. METHODEN	15
2.2.1. Präparation von Erythrozytenghosts	15
2.2.2. Isolierung von Adipozyten aus Rattenfettgewebe	15
2.2.3. Inkubation von isolierten Adipozyten mit Insulin	16
2.2.4. Herstellung von Fettzellhomogenaten zur PDH-Bestimmung	17
2.2.5. Herstellung von Fettzellhomogenaten zur Phospholipase-C-Bestimmung	17
2.2.6. Isolierung von Fettzellmembranen mittels Dichtegradientenzentrifugation	17
2.2.7. Mitochondrienpräparation aus Fettzellen	18
2.2.8. Mitochondrieninkubation	19
2.2.9. Präparation isolierter Hepatozyten	20
2.2.10. Inkubation der Hepatozyten	22
2.2.11. Bestimmung der Phospholipase-C-Aktivität	22
2.2.11.1. Inkubation der Zellaufschlüsse mit PI	23
2.2.11.2. Phosphatbestimmung nach Rouser et al.(100)	23
2.2.11.3. Bestimmung der Phospholipase-C-Aktivität nach Inkubation mit ^3H -markiertem PI	24
2.2.11.4. Proteinbestimmung des Zellmaterials	25

	Seite
2.2.12.	Bestimmung von aktiver Form (PDH _a) und PDH-Gesamtaktivität 25
2.2.13.	Messung des LDH-Ausstroms aus Leberzellen 26
2.2.14.	Messung der (1- ¹⁴ C)-Glukoseoxidation 27
2.2.15.	Messung der Formiatoxidation nach DeHaën (79) 28
3.	ERGEBNISSE 29
3.1.	VERSUCHE ZUR MESSUNG DER PHOSPHOLIPASE-C AN ERYTHROZYTENGHOSTS 29
3.1.1.	Abhängigkeit der Phospholipase-C-Aktivität von der Desoxycholatkonzentration 29
3.1.2.	Zeitabhängigkeit der Erythrozyten- Phospholipase-C 30
3.1.3.	Inkubation der Erythrozytenghosts mit Insulin 31
3.2.	VERSUCHE ZUM MECHANISMUS DER INSULINAKTIVIERUNG DER PHOSPHOLIPASE-C AN FETTZELLEN 34
3.2.1.	Reversibilität der Insulinaktivierung der Phospholipase-C 34
3.2.2.	Einfluß von Na-Vanadat auf die Phospholipase-C-Inaktivierung 36
3.2.3.	Einfluß von NaF auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit der Phospholipase-C 37
3.2.4.	Einfluß von EGTA auf die Stabilität der Insulinaktivierung der Phospholipase-C 39
3.2.5.	Versuche zur Stimulierbarkeit der Phospholipase-C durch ATP 41
3.2.6.	Versuche an Fettzellmembranen 43

3.3.	VERSUCHE ZUR STIMULIERBARKEIT DER LEBERZELL-PDH DURCH INOSITPHOSPHATE	47
3.3.1.	Permeabilisierung von Hepatozyten mit Digitonin und Saponin - Überprüfung der erfolgten Permeabi- lisierung durch Messung des LDH-Ausstromes	47
3.3.2.	Versuche zur Stimulierung der Leberzell-PDH mit verschiedenen Mengen IP_3	50
3.3.3.	Versuche zur Stimulierung der Leberzell-PDH mit IP_2	52
3.4.	VERSUCHE ZU INSULINÄHNLICHEN WIRKUNGEN VON PHOR- BOLESTERN AN FETTZELLEN	54
3.4.1.	Versuche zur Stimulierbarkeit der Fettzell-PDH durch verschiedene Mengen verschiedener Phorbol- ester	54
3.4.2.	Stimulierbarkeit der Fettzell-PDH durch 10 μM TPA und 1 μM 4- β -PDD in glukosefreiem Inkuba- tionsmedium	56
3.4.3.	Einfluß von Phorbolestern auf die PDH isolierter Fettzellmitochondrien	58
3.4.4.	Versuche zur Stimulierbarkeit der Fettzell-PDH bei gleichzeitiger Inkubation der Fettzellen mit Insulin und stimulierenden Phorbolestern	60
3.4.5.	Wirkung verschiedener Phorbolester auf die Glukose- oxidation an Fettzellen	61
3.4.6.	Wirkung verschiedener Phorbolester auf die Formiat- oxidation an Fettzellen	63
4.	DISKUSSION	66

	Seite
5. ZUSAMMENFASSUNG	76
6. LITERATURVERZEICHNIS	79
LEBENS LAUF	87

1. EINLEITUNG

Seit der Entdeckung des Insulins durch Banting und Best 1922 (4) wurden viele Wirkungen dieses Hormons auf den Kohlehydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel entdeckt und aufgeklärt. Sanger (101) lieferte die Primärstruktur des Insulins. Obwohl die regulativen Effekte des Insulins auf den Stoffwechsel der verschiedenen Zielgewebe, besonders der Leber, des Muskels und des Fettgewebes hinreichend bekannt sind, ist immer noch unklar, wie das Insulinsignal vom Rezeptor an der Außenseite der Zellmembran in die Zelle hinein weitergeleitet wird, um dort zu den bekannten Insulineffekten, wie der Stimulierung des Glukosetransports, der Glukoseoxidation, der Lipidsynthese und zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung zellulärer Proteine zu führen.

Nach der heute am meisten vertretenen Ansicht wird die Signalübertragung des Insulins durch einen oder mehrere second messenger vermittelt - im Prinzip ähnlich wie im Falle der β -adrenergen Signalvermittlung (111).

Durch Anlagerung eines Hormons (z.B. Adrenalin) an seinen spezifischen Rezeptor an der Zellmembran wird durch diesen ein in seiner Nähe lokalisiertes Enzym (Adenylatcyclase) aktiviert, das daraufhin einen Botenstoff, den second messenger (cAMP) freisetzt. Dieser ist in der Zelle frei beweglich und vermittelt die Hormonwirkung durch Aktivierung verschiedener Proteinkinasen. Damit das Übertragungssystem für ein folgendes Signal empfindlich bleibt, unterliegt der second messenger einem schnellen katabolischen Umsatz.

Ein in seinen Grundlagen umfassend erforschter schneller Effekt des Insulins ist die Aktivierung des mitochondrialen Pyruvatdehydrogenasekomplexes im Rattenfettgewebe, die vor etwa 15 Jahren entdeckt wurde (29, 54, 120). Die PDH wird dabei durch Umwandlung der inaktiven, phosphorylierten PDH (PDH_b) in die

aktive, dephosphorylierte Form (PDH_a) aktiviert. Diese Entdeckung führte zur Erklärung des seit lange bekannten stimulierenden Effektes des Insulins auf die Fettsäuresynthese, da die PDH ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym bei der Umwandlung von Glukose in Fettsäuren ist (123). An der PDH der Rattenfettzelle lassen sich so aufgrund ihrer mitochondrialen Lokalisation und ihrer Stimulierbarkeit durch Insulin Hypothesen zur Vermittlung dieses Hormonsignals studieren.

Das inzwischen gut bekannte, von Sutherland und Rall (112) beschriebene System mit cAMP als second messenger kann für die Aktivierung des PDH-Komplexes keine Rolle spielen (27, 31, 122), da cAMP nämlich keinen Einfluß auf die, die PDH-Aktivität regelnden Enzyme Kinase und Phosphatase hat (30, 54, 105). Bei Abwesenheit anderer Hormone hatte Insulin außerdem keinen Einfluß auf den cAMP-Spiegel im Fettgewebe (31). Wieland (122) postulierte folgende Möglichkeiten zum Aktivierungsmechanismus der PDH durch Insulin:

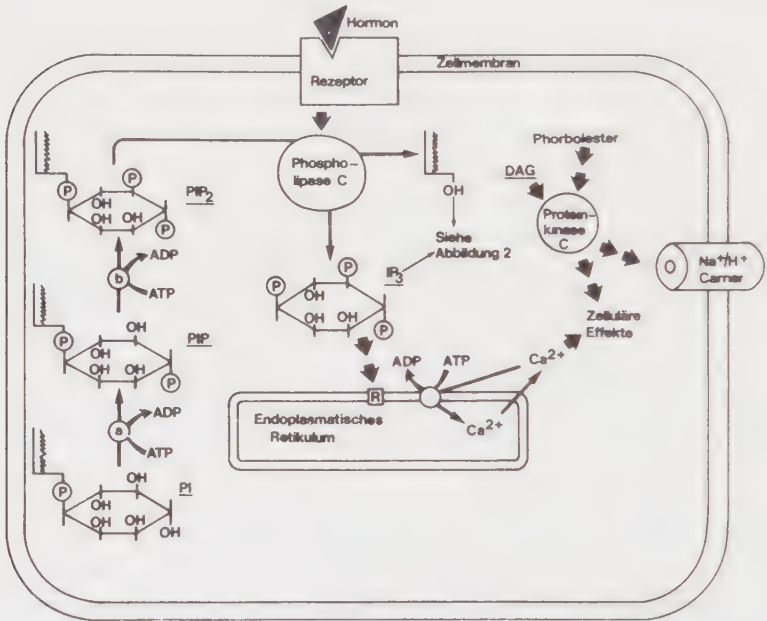
- 1.: Änderung bestimmter Metabolite, die als Regulatoren der PDH eine Rolle spielen könnten.
- 2.: Bildung von H₂O₂, das als second messenger eine Rolle spielen könnte. H₂O₂ kann an Fettzellen sämtliche Wirkungen des Insulins hervorbringen (79), so vermag es auch die PDH zu stimulieren (92). Unklar blieb hier jedoch der Ort und der Mechanismus der intrazellulären H₂O₂-Bildung.
- 3.: Larner et al. (65) postulierten ein Peptid oder peptid-ähnlichen Faktor, der durch Insulin in der Zellmembran gebildet wird und als Mediator für die Aktivierung der Glykogensynthase, und wie später von anderen berichtet wurde (52, 102, 103), auch als Aktivator der PDH dienen soll. Jedoch blieb die Isolierung und nähere Charakterisierung eines solchen Peptid-second messengers trotz intensiver Suche erfolglos (66).

In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, daß Metabolite des Phospholipidstoffwechsels eine Rolle bei der Übermittlung des Insulinsignals in die Zelle spielen könnten. Daher an dieser Stelle eine kurze Übersicht über das derzeitige Modell der Vermittlung hormoneller Signale über den Phosphatidylinositstoffwechsel (10, 12, 13, 36, 37, 78, 81, 82, 84):

Hokin und Hokin (47) entdeckten als erste, daß der Einbau von ^{32}P in Phospholipide, besonders von PI und Phosphatidsäure im Pankreas durch Acetylcholin stimuliert wird und deckten damit einen Zusammenhang zwischen externem Hormonsignal und intrazellulärem Phospholipidstoffwechsel auf. Michell (80) stellte die Hypothese auf, daß vermehrter Phospholipidstoffwechsel mit der Aktionsweise derjenigen Hormone zusammenhängt, die eine intrazelluläre Calciumfreisetzung bewirken. Inzwischen mehren sich die Hinweise, daß ein enger Zusammenhang zwischen PI-, beziehungsweise Inositphosphat-Umsatz und Calciumfreisetzung bei der Stimulierung vieler Zelltypen durch verschiedene Hormone besteht (5, 6, 17, 69, 110, 117). Berridge und Irvine (13) postulierten nun, daß IP_3 , das bei der Spaltung von PIP_2 entsteht, der second messenger ist, der zwischen dem Rezeptor an der Zellmembran und den intrazellulären Calciumspeichern das Hormonsignal weiterträgt. Über die intrazelluläre Calciumerhöhung würden verschiedene Enzyme aktiviert und somit regelnd auf verschiedene Stoffwechselwege eingewirkt.

Die Reaktionen des Phosphatidylinosit-Zyklus, die zur Bildung und zum Abbau von IP_3 führen, sind in Abbildung 1 und 2 gezeigt:

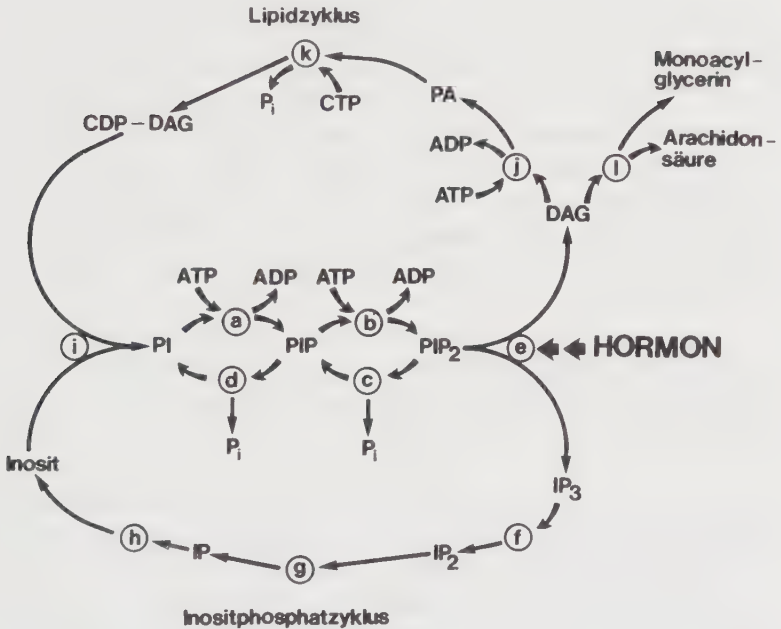
Abb. 1: Bildung von IP_3 und DAG und deren mögliche Rolle als second messengers (nach 13)



Nach Bindung eines Hormons am Rezeptor stimuliert dieser auf noch ungeklärte Weise die Phospholipase-C, die PIP_2 durch Hydrolyse in IP_3 und DAG spaltet. IP_3 könnte dadurch second messenger-Funktion ausüben, daß es aus dem endoplasmatischen Retikulum und anderen intrazellulären Speichern Calcium freisetzt. IP_3 wird durch Abspaltung eines Phosphatrestes successive inaktiviert. DAG, das andere Spaltprodukt aus PIP_2 , könnte seine Wirkung durch Aktivierung der Proteinkinase-C entfalten.

a: PI-Kinase; b: PIP_2 -Kinase; $\leftarrow$ enzymatische Umwandlung; $\blacktriangleleft$ Stimulierung

Abb. 2: Phosphatidylinosit-Stoffwechsel und Signalübertragung
(nach 13)



Ein Inositphosphatzyklus sorgt für die Bildung von freiem Inosit aus IP₃, das mit CDP-DAG verbunden wird, um wieder PI zu bilden. CDP-DAG ist das Produkt eines Lipidzyklus, der DAG wieder zur PI-Synthese zurückschleust. DAG kann aber auch dem Kreislauf entzogen werden und in Arachidonsäure und Monoacylglycerin zerlegt werden. Im Kreislauf zwischen PI und PIP₂ wird ein Vorrat an PIP₂ bereitgestellt, das als Glied in der Signalübertragungskette in den second messenger IP₃ und DAG gespalten wird. a: PI-Kinase; b: PIP-Kinase; c: PIP₂-Phosphomonoesterase; d: PIP-Phosphomonoesterase; e: Phospholipase-C; f: IP₃-Phosphatase; g: IP₂-Phosphatase; h: IP-Phosphatase; i: CDP-DAG-Inositolphosphatidtransferase; j: DAG-Kinase; k: CDP-Phosphatidattransferase; l: DAG-Lipase; PA: Phosphatidsäure

PI ist an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert und wird durch schrittweise Phosphorylierung unter Verbrauch von ATP zuerst in 4er- und dann in 5er-Position des Inositringes in PIP_2 umgewandelt. Genauso wie es Kinasen für die Phosphorylierung von PI gibt, gibt es Phosphomonoesterasen, die PIP_2 wieder in PI zurückverwandeln. Dadurch entsteht ein Kreislauf, in dem PI ständig phosphoryliert- und PIP_2 und PIP ständig dephosphoryliert werden. Es wird auf diese Weise ein konstanter pool an PIP_2 aufrechterhalten. Besetzung des Rezeptors durch ein Hormon führt zur Aktivierung der Phospholipase-C, die PIP_2 in IP_3 und DAG spaltet und somit dem oben beschriebenen Kreislauf entzieht. Phospholipase-C zieht als Substrat PIP_2 dem PI und PIP vor (11).

Ein noch nicht aufgeklärter Bestandteil dieses Signalübertragungssystems ist die Verbindung zwischen Rezeptor und Phospholipase-C. Hierzu bestehen folgende Vorstellungen:

- 1.: Das Hormon bewirkt am Rezeptor eine Konformationsänderung. Dadurch ändert sich der Membranaufbau und PIP_2 wird so der Phospholipase-C leichter zugänglich gemacht (51).
- 2.: Ein GTP-bindendes Protein könnte das Verbindungsglied zwischen Rezeptor und Phospholipase-C darstellen (40) und die Phospholipase-C aktivieren (23).
- 3.: Das Hormon könnte eine Phosphorylierung des Rezeptors bewirken, der selbst enzymatische Eigenschaften besitzt, durch Phosphorylierung aktiviert wird und daraufhin andere Enzyme, zum Beispiel Phospholipase-C, aktiviert. Anhaltspunkte für diese Hypothese bestehen für den Insulinrezeptor, der durch Autophosphorylierung eine tyrosinspezifische Proteinkinase-untereinheit aktiviert (57, 58), die andere zelluläre Proteine phosphorylieren kann (75).

Die intrazellulären IP_3 - und DAG-Spiegel werden durch ihre Bildung aus PIP_2 und ihrem Abbau, der sie auf zwei Stoffwechselwegen wieder der PIP_2 -Bildung zuführt, bestimmt (s. Abbildung 2). DAG wird dabei über eine DAG-Kinase zu Phosphatidsäure umgebaut, diese wird an CTP gekoppelt und bildet CDP-DAG. CDP-DAG reagiert mit Inosit unter Bildung von PI, das durch oben beschriebene Phosphorylierung dem System wieder zur Verfügung gestellt wird. IP_3 wird durch eine Inositrtriphosphatase als second messenger inaktiviert, als erstes wird das Phosphat in 5er-Position abgespalten. Durch weitere, schrittweise Dephosphorylierung entsteht Inosit, das wieder mit CDP-DAG reagieren kann. Beide Spaltprodukte, IP_3 und DAG, werden auf diese Weise schnell wieder der PIP_2 -Bildung zugeführt. Der Schlüsselprozeß in der Signalübertragung ist die Hydrolyse des PIP_2 durch Phospholipase-C. Das dabei entstehende IP_3 setzt aus intrazellulären Speichern, wie zum Beispiel dem endoplasmatischen Retikulum, Calcium frei (11, 12, 15, 110).

Auch DAG hat in der Zelle die Funktion eines second messengers. Im Gegensatz zu IP_3 tritt es jedoch nicht über denselben Mechanismus in Aktion. DAG stimuliert vielmehr Proteinkinase-C (55, 86, 87, 88), die ihrerseits Einfluß auf Enzymaktivierung und Zellproliferation nimmt. Die genaue Funktion der Proteinkinase-C ist dabei noch nicht bekannt; sie wird außerdem durch tumorinduzierende Phorbolester stimuliert und wirkt wahrscheinlich auf die Na^+/H^+ -Austauschpumpe (18, 19, 98).

Ein wichtiger Aspekt dieses zweiseitenkligen Signalübertragungssystems mit IP_3 und DAG als second messengers ist, daß beide synergistisch miteinander interagieren können (87). Dagegen spricht jedoch, daß Proteinkinase-C den Calciumtransport hemmt (64). Der Calciumweg könnte aber auch so durch den DAG-Über-

tragungsschenkel in seiner Empfindlichkeit und damit Ansprechbarkeit beeinflusst werden. DeChaffoy DeCourcelles et al. (20) beschrieben eine andere Interaktion zwischen beiden Messengern: demnach bewirkt die Stimulierung der Proteinkinase-C eine vermehrte Bildung von PIP_2 . DAG könnte so eine positive Rückkopplung im Signalübertragungssystem bewerkstelligen.

Ein sehr wichtiger Hinweis, daß das IP_3 /DAG-Messengersystem bei der Übertragung des Insulinsignals eine Rolle spielen könnte, kam bereits 1966 von DeTorrentegui und Berthet (119), die zeigen konnten, daß insulinbehandelte Fettzellen vermehrt ^{32}P in Phosphatidsäure und PI einbauen. Dies wurde von Farese et al. (35) bestätigt.

Rodbell stellte in den 60er-Jahren fest, daß exogen zugesetzte Phospholipase-C an Fettzellen insulinähnliche Stoffwechselwirkungen hervorrufen kann (95, 96); so kann sie zum Beispiel die Glukoseoxidation, die Glukoseaufnahme und den Glukoseumbau in Fett stimulieren und die Lipase hemmen (16, 34, 39, 48, 97).

Aufgrund dieser Arbeiten untersuchten Köpfer-Hobelsberger und Wieland (61) die Wirkung von Phospholipase-C auf die PDH. Sie konnten zeigen, daß bei Fettzellen exogen zugeführte Phospholipase-C die PDH zu stimulieren vermag. Bei der Stimulierung der PDH durch Phospholipase-C fällt auf, daß sie im Ausmaß und zeitlichen Verlauf der Stimulierung der PDH durch Insulin sehr ähnelt. Es lag daher die Vermutung nahe, daß die Signalübertragung des Insulins vom Rezeptor zur mitochondrialen PDH über eine Aktivierung der endogenen Phospholipase-C stattfindet; analog dem von Berridge und Irvine (13) postulierten Messengersystem.

Um diese Hypothese zu untermauern, wurde sowohl die Phospholipase-C-Aktivität, als auch die PDH-Aktivität an denselben Homogenaten insulininkubierter Fettzellen gemessen. Hierbei ließ sich bestätigen, daß die endogene Phospholipase-C durch Insulin stimuliert wird. Der zeitliche Verlauf sowie die Dosis/Wirkungskurve der Stimulierung der Phospholipase-C stimmt etwa mit der der PDH überein. Ferner ist zur Stimulierung der Phospholipase-C durch Insulin, wie bei der PDH, die Anwesenheit von Ca^{2+} und Glukose im Inkubationsmedium notwendig. Dieser Befund wird als weiteres Indiz dafür gewertet, daß die Stimulierung der PDH durch Insulin über die Aktivierung endogener Phospholipase-C stattfindet.

Weiterhin konnte vor kurzem gezeigt werden (62), daß IP_3 die PDH an permeabilisierten Fettzellen aktivieren kann, und zwar ähnlich wie Insulin. EGTA im Inkubationsmedium unterband die Aktivierung der PDH; ein Hinweis darauf, daß Ca^{2+} bei der PDH-Aktivierung eine Rolle spielt. An isolierten Fettzellmitochondrien hatte IP_3 keinen Effekt. Die Aktivierung findet also nicht durch IP_3 selbst statt, sondern wird über einen durch IP_3 ausgelösten, an die intakte Zelle gebundenen Mechanismus ausgelöst, wie zum Beispiel der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern.

Ein weiterer Hinweis, daß der PI-Zyklus eine Rolle bei der Übertragung des Insulinsignals spielen könnte, basiert auf Beobachtungen von Machicao und Wieland (77), die darauf hindeuten, daß die tyrosinspezifische Proteinkinase des Insulinrezeptors in vitro neben Aktin und vielen anderen Proteinen (76) auch endogenes- und exogen angebotenes PI phosphorylieren kann. Es scheint also denkbar, daß in vivo das erste Substrat der ak-

tivierten Rezeptorkinase membrangebundenes PI ist, was interessant im Zusammenhang mit dem Befund von Berridge ist (11), daß PIP_2 als Substrat von der Phospholipase-C dem PI vorgezogen wird.

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Zusammenhänge zwischen Phospholipidstoffwechsel und Übertragung des Insulinsignals zu untersuchen.

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit der Rolle der Phospholipase-C. Zuerst sollte die Rolle der Phospholipase-C an Erythrozytenghosts untersucht werden. Hierbei lagen folgende Vorstellungen zugrunde: Erythrozyten sind leichter zugänglich und in größerer Menge erhältlich, als Adipozyten aus Rattenfettgewebe. Erythrozytenghosts stellen ein System dar, an dem der Komplex Zellmembran/Insulinrezeptor isoliert studiert werden kann. Ferner sollte untersucht werden, ob Erythrozytenghosts Phospholipase-C in größeren Mengen besitzen und ob diese ähnliche Eigenschaften besitzt, wie die der Fettzellen, speziell, ob auch sie durch Insulin stimulierbar ist. Sodann wurden an Fettzellen Versuche zum Mechanismus der Phospholipase-C Aktivierung durch Insulin unternommen. Hierbei wurde besondere Aufmerksamkeit einem möglichen, durch den Rezeptor ausgelösten Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsmechanismus, der bei der Aktivierung der Phospholipase-C durch Insulin eine Rolle spielen könnte, geschenkt.

Der zweite Teil der Arbeit ist der Rolle der Inositphosphate als second messenger gewidmet. Es wurde untersucht, ob Inositphosphate in einem anderen Zellsystem, in diesem Falle an der isolierten Leberzelle, deren PDH nicht durch Insulin stimulierbar ist (90, 93), die PDH, wie an Fettzellen, stimulieren können.

Im dritten Teil wird untersucht, ob Phorbolester, die die Proteinkinase-C aktivieren können, an Fettzellen insulinähnliche Wirkungen hervorrufen. So wurde der Einfluß der Phorbolester auf die PDH intakter Fettzellen, sowie auf die PDH isolierter Mitochondrien untersucht. Ferner wurde der Einfluß von Insulin und Phorbolestern sowohl auf die Glukoseoxidation, als auch auf die Formiatoxidation studiert, letzteres als Indikator der Bildung von H_2O_2 als potentieller Signalüberträger.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. MATERIALIEN

2.1.1. Chemikalien

Amersham, Braunschweig	^{14}C -Formiat, ($1\text{-}^{14}\text{C}$)-Glukose, L-3-Phosphatidyl(2- ^3H)inosit 17,1 Ci/mM
Apotheke des Städt. Krankenhauses München Schwabing	Biuret Reagenz, TCA
Boehringer, Mannheim	alle organischen Materialien, soweit nicht anders vermerkt
CEVA, Badseberg	Na-Pentobarbital, "Nembutal"
Ega Chemie, Steinheim	Na-Vanadat
ICI, Frankfurt	Lubrol PX
Interchem, Chemische Produkte, München	Kollagenase Typ Worthington CLS
Linde, München	Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2)
Merck, Darmstadt	alle organischen Chemikalien, Dinonylphthalat, Dioxan, EDTA, pNA, Tris
Merz und Dade AHS Deutschland GmbH, München	Lab-Trol E
New England Nuclear, Dreieich	Phosphatidylinosit L-a-(myo-inosit-2- $^3\text{H}(\text{N})$) 2,3 Ci/mM
Nordmark Werke GmbH, Hamburg	Heparin "Thrombophob" 5000 E/ml

Novo Industrie Pharmaceutica, Mainz	Insulin Actrapid MC
Roth KG, Karlsruhe	Saccharose, Szintillationsgel
Serva Feinbiochemica Heidelberg	D,L-Carnitin, Digitonin EGTA, Trypanblau
Sigma, Taufkirchen	BSA, HEPES, D-myo-Inositoltrisphosphat, Phenylethylamin, Phorbol ester, L-a- Phosphatidylinosit, Saponin
Wacker Chemie, München	Silikonöl AK 20

2.1.2. Geräte

Bachofar Laboratoriums- geräte, Reutlingen	Wärmeblock (180°C)
B. Braun, Melsungen	Ultraschall Labsonic 1510 Microdismembrator
Cenco Deutschland GmbH, Haan	Magnetrührer, Whirlmix
Deuster, München	Rollpumpe Favorit 5000
DuPont, Norwalk, Conn., U.S.A.	Sorvall RC 5B Zentrifuge
Eigenbau	thermokonstante Perfusionskammer
Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, Hamburg	Micropipetten, Plastik-Einwegmaterialien, Photometer 1101 mit Kompensationsschreiber 6512, Thermostat 3401, Zentrifuge 3200
Gesellschaft für Labor- technik mbH und Co., Hannover	Schüttelwasserbad
Hettich, Tuttlingen	Rotixa Zentrifuge

Hillerkurs, Krefeld	pH-Meter PHM 62 Radiometer, Copenhagen
Inst. Lab. Inc., Oberlin, Ohio, U.S.A.	Gilford Spectrophotometer 250
Janke und Kunkel KG, IKA-Werke, Staufen	Ultra-Turrax
E. Leitz GmbH, Wetzlar	Phasenkontrastmikroskop "Orthoplan"
Packard, Frankfurt	Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb 574
Potter-Elvehjem	Glas-Teflon Homogenisierer
Spoerhase AG, Giessen	Waage Mettler P 160
Karl Zeiss KG, Oberkochen	Refraktometer

2.1.3. Versuchstiere

männliche Sprague-Dawley Ratten von 140-240 g Gewicht wurden von Ivanovas, Kisslegg, Allgäu bezogen und unter Standardbedingungen (22-24°C, 50% Luftfeuchtigkeit, 12 h Licht; 7:00-19:00 Uhr) gehalten. Als Standarddiät wurde "Ssniff" Alleindiät für Ratten (Soest) verwendet. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

2.2. METHODEN

2.2.1. Präparation von Erythrozytenghosts

Die Präparation erfolgte nach einer modifizierten Methode von Downes et al. (33). 50-100 ml frisches Citratblut wurden 5 min bei 4500 rpm in der Hettich Zentrifuge zentrifugiert. Plasma und buffy coat wurden mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Sodann wurden die Erythrozyten dreimal mit 154 mM NaCl + 1,5 mM HEPES, pH 7,4 gewaschen. Die gepackten Erythrozyten wurden in 30-fachem Volumen 5 mM Tris/HCl pH 7,6 bei 4°C unter Rühren hämolysiert. Danach wurde das Hämolysat 20 min bei 48000 Xg in der Sorvall Zentrifuge zentrifugiert. Der hämoglobinhaltige Überstand wurde verworfen, die Erythrozytenmembranen wurden in 5 mM Tris/HCl pH 7,6 solange gewaschen, bis der Überstand hämoglobinfrei war. Hierzu waren fünf bis acht Waschgänge nötig. Die letzte Wäsche erfolgte mit 50 mM HEPES pH 7,6. Die im Pellet befindlichen Erythrozytenghosts wurden in zwei- bis dreifacher Menge 50 mM HEPES pH 7,6 aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.2. Isolierung von Adipozyten aus Rattenfettgewebe

Die Herstellung von isolierten Fettzellen erfolgte nach der Methode von Rodbell (94). Ratten wurden durch Genickschlag getötet. Das Nebenhodenfettgewebe sowie das retroperitoneale Fettgewebe wurden entfernt und in verschraubbare Plastikinkubationsgefäße zur Kollagenaseverdauung gegeben, in die pro Gramm Fettgewebe 2 ml 5% BSA-HEPES-Puffer (5% BSA in 121 mM

NaCl; 5 mM KCl; 3 mM CaCl₂; 1 mM KH₂PO₄; 1 mM MgSO₄; 25 mM HEPES; pH 7,4), 2 µl 550 mM Glukose, sowie 3,6 mg Kollagenase vorgegeben waren. Das Fettgewebe wurde mit einer Schere zerkleinert. Nach Begasen mit Carbogen wurde das Gefäß luftdicht verschraubt und ca. 40 min bei 37°C im Schüttelwasserbad mit 120 Anschlägen/min inkubiert. Das verdaute Fettgewebe wurde nun durch doppellagige Verbandsgaze in ein Polyethylenröhrchen filtriert und mit 1,25% BSA-HEPES-Puffer aufgefüllt. Danach erfolgte eine Zentrifugation in der Hettich Zentrifuge bei 400 rpm für 2 sec. Der wässrige Unterstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Zellen wurden dreimal auf diese Weise gewaschen. Adipozyten, an denen später Phosphatgehalt gemessen wurde, wurden mit phosphatfreiem BSA-HEPES-Puffer gewaschen und weiter phosphatfrei behandelt.

2.2.3. Inkubation von isolierten Adipozyten mit Insulin

Fettzellen wurden in Polyethylenröhrchen oder größeren Plastikgefäßen, je nach Volumen des Inkubationsansatzes, in der fünffachen Menge 2,5% BSA-HEPES-Puffer und der gewünschten Menge Insulin inkubiert (92). Glukose wurde in 1 mM Endkonzentration zugegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen wie oben abzentrifugiert, der Unterstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zur PDH-Bestimmung (s. 2.2.12.) wurden 200 µl Zellen auf 200 µl Dinonylphthalat pipettiert und nach 2 sec Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge in flüssigem N₂ tiefgefroren. Für die Herstellung von Fettzellhomogenaten zur Phospholipase-C-Bestimmung (s. 2.2.5.) wurden die Zellen zweimal mit 50 mM Tris/Maleat pH 7,4 gewaschen und anschließend in Polyethylenröhrchen ebenfalls in flüssigem N₂ tiefgefroren.

2.2.4. Herstellung von Fettzellhomogenaten zur PDH-Bestimmung

Nach der Entnahme aus dem flüssigen N₂ wurden die gefrorenen zelligen Überstände vom Dinonylphthalat abgeklopft und zusammen mit 400 µl Tris/Lubrol (15 mM Tris pH 7,0 bei 5°C; 0,2% Lubrol PX und 5% Rattenserum), sowie 3,5 ml Silikonöl AK 20 im Eisbad im Ultra-Turrax zweimal 20 sec mit 20 sec Pause aufgeschlossen. Das Homogenat wurde bei 4°C 1 min in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert; die mittlere, wässrige Phase wurde mit einer Spritze abgesaugt und bis zur PDH-Bestimmung (s. 2.2.12) wieder in flüssigem N₂ tiefgefroren.

2.2.5. Herstellung von Fettzellhomogenaten zur Phospholipase-C-Bestimmung

Die in 50 mM Tris/Maleat pH 7,4 gewaschenen Adipozyten wurden in der doppelten Menge des selben Puffers im Eisbad 5 mal 30 sec mit je 30 sec Pause im Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde 2 min bei 16000 Xg in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert, die mittlere, wässrige Phase mit einer Spritze abgesaugt und bis zur Bestimmung der Phospholipase-C-Aktivität (s. 2.2.11.) in flüssigem N₂ tiefgefroren (61).

2.2.6. Isolierung von Fettzellmembranen mittels Dichtegradientenzentrifugation (8)

ca. 5 g Fettgewebe vom Rattennebenhoden oder -Retroperitoneum wurden zusammen mit 8 ml Sucrose-Puffer (0,25 M Sucrose, 10 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 7,4) in große Polyethylenröhrchen gegeben. Das Fettgewebe wurde mit einer Schere zerkleinert, an-

schließlich wurde es im Ultra-Turrax 30 sec homogenisiert. Der so entstandene Rohextrakt wurde nun 30 sec bei 2500 rpm in der Hettich Zentrifuge zentrifugiert, der Unterstand mit einer Spritze abgesaugt und weiter verarbeitet, der Fettpfropf wurde verworfen. Es erfolgte nun eine Zentrifugation des Unterstandes für 30 min in der Sorvall Zentrifuge bei 48000 Xg. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet aus Membranen und Zellorganellen wurde in ca. 1 ml Sucrose-Puffer aufgenommen und anschließend mit einem Glaspotter dreimal gepottert. Die so entstandene Suspension wurde in ein durchsichtiges Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 8 ml Gradientenpuffer aufgefüllt (Herstellung des Gradientenpuffers aus: a) Percoll; b) 2 M Sucrose, 80 mM Tris, 8 mM EDTA, pH 7,4; c) Sucrose-Puffer wie oben. a, b, c wurden im Verhältnis 7:1:32 gemischt, die Dichte wurde am Refraktometer überprüft und auf 1,05 eingestellt.). Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte in der Sorvall Zentrifuge bei 10800 Xg für 15 min. Danach befanden sich die Membranen im Überstand. Sie wurden abgenommen und zweimal in Puffer mit 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4 gewaschen. Dazu wurde in der Sorvall Zentrifuge 20 min bei 48000 Xg zentrifugiert. Anschließend wurden die Membranen in 50 mM Tris/Maleat pH 7,4 aufgenommen und sofort für die weiteren Versuche verwendet.

2.2.7. Mitochondrienpräparation aus Fettzellen

Mitochondrienpräparation erfolgte nach der Methode von Löffler et al. (70). Fettzellen wurden wie schon beschrieben hergestellt und nach dreimaligem Waschen mit 1,25% BSA-HEPES-Puffer noch zusätzlich zweimal mit Sucrose-Medium (0,25 M Sucrose, 7,5 mM Gluthation, 2 mM EDTA, 20 mM Tris, 2% BSA, pH 7,4 bei 37°C) gewaschen. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten bei

0-4°C. Die Zellen wurden nun mit dem doppelten Volumen Sucrose-Medium (wie oben, jedoch pH 7,4 bei 5°C) durch zweimaliges Auf- und Abfahren des Stempels in einem Glas-Teflon Potter homogenisiert. Das Fett und die Kerne wurden durch eine 2 min Zentrifugation in der Sorvall Zentrifuge bei 3000 Xg abgetrennt. Alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgten in dieser Zentrifuge bei 10000 Xg. Die flüssige, mittlere Phase wurde weiterverarbeitet, der fettige Überstand, sowie das zellkernhaltige Pellet wurden verworfen. Es folgte eine 7 min Zentrifugation. Das Mitochondrienpellet wurde nun einmal in Sucrose-Medium und ein weiteres mal in KCl-Medium (130 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 2 mM KH₂PO₄, 5 mM Tris, 0,5% BSA, pH 7,4 bei 5°C) gewaschen. Hierbei wurde wieder 7 min zentrifugiert. Das Mitochondrienpellet wurde in KCl Medium aufgenommen (0,5 ml pro 5 g Fettgewebe) und durch dreimaliges Auf- und Abfahren des Stempels im Glas-Teflon Potter homogenisiert.

2.2.8. Mitochondrieninkubation

25 µl der Mitochondrien wurden in offenen Cups mit 100 µl KCl-Medium, das die für die jeweilige Inkubation verwendeten Zusätze enthielt, bei 25°C 9 min im Wärmeblock inkubiert. Inkubationsstopp erfolgte durch 1 min Zentrifugation in der Eppendorf Tischzentrifuge bei 4°C. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das Mitochondrienpellet sofort in flüssigem N₂ tiefgefroren.

Zur PDH-Aktivitätsbestimmung wurden zum kurz angetauten Pellet 100 µl Tris/Lubrol (s. 2.2.4.) pipettiert. Aufschluß der Mitochondrien erfolgte durch kräftiges Mixen des Tris/Lubrol mit dem Mitochondrienpellet auf dem Whirlmix mit Hilfe eines Einmalspatels. Das so entstandene Homogenat wurde in flüssigem N₂ tiefgefroren, noch einmal aufgetaut und bis zur PDH-Bestimmung abermals tiefgefroren.

2.2.9. Präparation isolierter Hepatozyten

Die für die Präparation benötigten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

Ca²⁺-freier Krebs-Henseleit-Puffer (63):

1000 ml	NaCl	0,9%
40 ml	KCl	1,15%
10 ml	KH ₂ PO ₄	2,11%
10 ml	MgSO ₄ X H ₂ O	3,8%
210 ml	NaHCO ₃	1,3%
1,27 ml	2 M D,L-Carnitin	

Carnitin wurde dem Puffer in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt, um eine Verarmung der Hepatozyten an Carnitin zu vermeiden (22).

BSA-Puffer:

BSA wurde mit 0,9% NaCl auf 2,54% verdünnt; der Puffer setzte sich genauso zusammen, wie Krebs-Henseleit-Puffer, anstelle des 0,9% NaCl wurde das wie oben hergestellte BSA-NaCl verwendet, zusätzlich wurden dem Puffer 127 µl 1,3 M CaCl₂ sowie 1,27 ml 1,5 M Glukose zugegeben.

Beide Puffer wurden frisch hergestellt und laufend mit Carbogen begast.

Leberzellen wurden aus 48 h gehungerten Ratten von 200-300 g Gewicht nach der Methode von Berry und Friend (14) präpariert. Die Ratten wurden mit 0,1 ml/100 g Körpergewicht einer 6% Nembutal-Lösung, die intraperitoneal gespritzt wurde, narkotisiert. Für die Leberperfusion wurden nur Ratten verwendet, die 5 min nach Nembutal-Injektion betäubt waren. Die darauffolgende Opera-

tionstechnik erfolgte nach der Standardmethode der Leberperfusion nach Ross (99): Leber und Pfortader wurden freigelegt, die Pfortader wurde kanüliert. Die Leber wurde sofort mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert, der Perfusionsdruck betrug 50 cm Wassersäule. Die Leber wurde aus dem Körper herauspräpariert und in einem offenen System in der Perfusionskammer weiterperfundiert, bis ca. 50 ml Puffer die Leber durchströmt hatten und so Erythrozyten und Plasmaproteine entfernt waren. Sodann wurde die Leber rezirkulierend mit 100 ml laufend begastem Puffer mit einer Flußrate von 50 ml/min perfundiert. Nach 5 min wurden 50 mg Kollagenase in 2 ml Puffer gelöst dem Perfusionssystem zugegeben. Die Perfusion wurde für weitere 20-30 min fortgesetzt, bis die Leber weich und etwas heller geworden war. Sodann wurde die Leber aus dem Perfusionssystem entfernt und in 20 ml BSA-Puffer mit der Schere zerkleinert. Unverdaute Gewebestückchen wurden entfernt und die Leberzellsuspension durch 4-lagige Gaze in Zentrifugenröhrchen filtriert. Die Leberzellen wurden zweimal in BSA-Puffer gewaschen, dabei nach jedem Waschen kurz mit Carbogen begast. Hierbei wurde in der Hettich Zentrifuge bei 1000 rpm 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Hepatozyten in der dreifachen Menge des selben Mediums resuspendiert und sofort für die nachfolgende Inkubation verwendet. Die Qualität der Zellpräparation wurde durch Trypanblaufärbung mikroskopisch ermittelt (10 μ l Zellen + 100 μ l 0,2% Trypanblau in 0,9% NaCl). Die nach dieser Methode präparierten Zellen schlossen zu 95-98% Trypanblau aus. Das Trockengewicht der Zellen betrug im Mittel 45 mg/ml.

2.2.10. Inkubation der Hepatozyten

Inkubation der Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Siess et al. (108). Als Inkubationspuffer wurde BSA-Puffer verwendet. In kleine Polyröhrchen wurden 0,9 ml Puffer und 0,1 ml Zellen gegeben. Das Gemisch wurde mit Carbogen begast, die Inkubationsgefäße wurden daraufhin luftdicht verschlossen und im Schüttelwasserbad (50 Anschläge/min) bei 37°C gehalten. Zusätze zum Inkubationsansatz wurden in gewünschter Konzentration vor Zugabe der Zellen dem Inkubationsmedium zugegeben. Zum Inkubationsstopp wurde das Inkubationsgemisch in Cups umgefüllt, diese wurden kurz in der Eppendorf Tischzentrifuge anzentrifugiert. Das Medium wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Zellen wurden danach sofort in flüssigem N₂ tiefgefroren. Zellaufschlüsse zur PDH-Bestimmung wurden wie bei Fettzellen hergestellt (s. 2.2.4.)

2.2.11. Bestimmung der Phospholipase-C-Aktivität

Testprinzip: Zellhomogenate oder Membranen werden mit PI inkubiert. Dabei wird PI durch Phospholipase-C in wasserlösliche Inositphosphate und DAG gespalten. Die Inositphosphate lassen sich quantitativ entweder über den Phosphatgehalt bestimmen oder bei Verwendung von ³H-markiertem PI über die nach Ausschütteln mit Chloroform/Methanol im wässrigen Überstand vorhandene Radioaktivität. Parallel wird vom Zellmaterial eine Proteinbestimmung durchgeführt. Aus der Menge an freiem anorganischen Phosphat, beziehungsweise ³H-markiertem Inosit und der Proteinkonzentration läßt sich die spezifische Aktivität der Phospholipase-C berechnen.

2.2.11.1. Inkubation der Zellaufschlüsse mit PI

erfolgte nach der Methode von Craven und DeRubertis (25). 50 μ l des Zellmaterials wurden jeweils mit- und ohne 10 μ l PI (10 mg/ml in 50 mM Tris/Maleat pH 7,4 durch Ultraschallbehandlung gelöst) und CaCl_2 in einer Endkonzentration von 1 mM 10 min bei 37°C im Wärmeblock inkubiert. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes wurde mit Tris/Maleat Puffer auf 110 μ l ausgeglichen. Der Inkubationsstopp erfolgte durch Zugabe von 20 μ l 70% HClO_4 und anschließendem kräftigen Mischen der Probe. Als Leerwerte für den darauffolgenden Phosphattest wurden Inkubationen mit- und ohne PI, aber ohne Zellmaterial durchgeführt.

2.2.11.2. Phosphatbestimmung nach Rouser et al. (100)

Nachdem die mit HClO_4 versetzten Proben 30 min bei 4°C aufbewahrt wurden, wurden sie 4 min bei 16000 Xg in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Ein Aliquot von 100 μ l des Überstandes wurde in fabrikneue, phosphatfreie Glasröhrchen pipettiert in die 240 μ l 70% HClO_4 vorgelegt waren. Als Standard wurde eine Eichkurve mit verschiedenen Mengen KH_2PO_4 -Lösung (0,1 mg/ml in 50 mM Tris/Maleat pH 7,4) mitgeführt. Die Röhrchen wurden mit Glasmurmeln verschlossen, die Proben 30 min bei 180°C im Wärmeblock gekocht, um anorganisches Phosphat aus den Inositphosphaten abzuspalten. Nach Abkühlen der Proben wurden zum Farbnachweis des Phosphates 920 μ l H_2O , 400 μ l 1,25% NH_4 Molybdat und 400 μ l 5% Ascorbinsäure zugegeben; die Proben wurden kräftig gemischt und anschließend 5 min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Nach Erkalten wurde der Phosphatgehalt der Proben am Gilford Spectrophotometer gegen einen phosphatfreien Leerwert bei 797 nm mit Rotfilter gemessen.

Zur Berechnung des tatsächlich aus Inositolphosphaten abgespaltenen Phosphates wurde vom Phosphatgehalt der mit PI inkubierten Proben der Phosphatgehalt der ohne PI inkubierten Proben abgezogen.

2.2.11.3. Bestimmung der Phospholipase-C-Aktivität nach Inkubation mit ^3H -markiertem PI

Zugrunde lag eine Methode von Low und Weglicki (72) modifizierte Methode. 60 μl des Zellmaterials wurden mit 10 μl ^3H -markiertem PI, entsprechend 20000 cpm, 10 μl unmarkiertem PI (1,1 mM), sowie CaCl_2 in einer Endkonzentration von 1 mM in Schliffgläsern 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das Volumen wurde für jeden Testansatz auf 110 μl ausgeglichen. Leerwerte mit radioaktivem PI, aber ohne Zellmaterial wurden mitgeführt. Inkubationsstopp erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Methanol, 1 ml Chloroform, sowie 0,2 ml 1 N HCl zur Phasentrennung. Nach kräftigem Schütteln wurden die Proben 10 min bei 200 rpm in der Hettich Zentrifuge zentrifugiert. Sodann wurde der Unterstand mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und verworfen, der wässrige Überstand zweimal mit 1 ml Chloroform/Methanol/HCl (86:14:1) gewaschen. Ein 0,4 ml Aliquot der wässrigen Phase wurde in Szintillationsgefäße pipettiert. Die Gefäße wurden mindestens 4 h stehen gelassen, um so eine geringere Zählkreisbeute durch Chloroformreste zu vermeiden. Anschließend wurde den Proben 10 ml Szintillationsgel zugegeben; die Radioaktivität wurde im Packard Szintillationszähler gemessen. Als Bezugsgröße wurden 10 μl des ^3H -markierten PI mitgeführt.

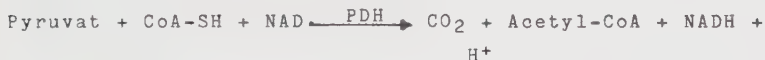
2.2.11.4. Proteinbestimmung des Zellmaterials

Proteinbestimmung von Fettzellhomogenaten und Fettzellmembranen erfolgte nach Lowry et al. (74) gegen einen Leerwert (H_2O). Als Standard wurde eine Eichkurve mit verschiedenen Mengen 1:250 verdünntem Lab-Trol E mitgeführt. Gemessen wurde am Eppendorf Photometer bei 578 nm.

Bei den proteinreicheren Erythrozytenghosts erfolgte die Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode (7). Als Standard wurde unverdünntes Lab-Trol E mitgeführt. Gemessen wurde am Eppendorf Photometer bei 546 nm gegen einen Leerwert (H_2O).

2.2.12. Bestimmung von aktiver Form (PDH_a) und PDH-Gesamtaktivität

PDH-Aktivität wurde mit dem AATase-Test gemessen (114). Hierbei liegt folgendes Testprinzip zugrunde (70, 91):



Durch die Umwandlung des gelbfarbigen pNA ergibt sich eine Farbabschwächung, die bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann.

In eine 250 μl Glasküvette wurden nacheinander pipettiert: 200 μl Testmix (6,5 mM Tris/HCl pH 8,2, 195 μM pNA, 13 mM MET, 0,5 mM MgCl_2 , 1,3 mM TPP, 1,3 mM NAD, 25 mM Pyruvat, 125 μM CoA), 50 μl Probe und 20-30 μl AATase (je nach spezifischer Aktivität der Präparation) zum Start der Reaktion. Absorption wurde bei 405 nm am Eppendorf Photometer gemessen.

Aus jeder Probe wurde, wie oben, der Anteil der aktiven Form der PDH (PDH_a) bestimmt, sowie die im Homogenat enthaltene Gesamt-PDH, d.h. die Summe aus aktiver und inaktiver Form. Die inaktive Form wurde folgendermaßen in die aktive Form umgewandelt:

30 μl Probe wurden mit 20 μl PDH-Phosphatase (107) und 5 μl 110 mM MgCl_2 15 min bei 25°C im Wärmeblock inkubiert. 50 μl dieses Inkubationsansatzes wurden in den AATase-Test eingesetzt. Aus beiden Absorptionsgrößen wurde der Anteil der PDH_a an der Gesamt-PDH in Prozent berechnet.

2.2.13. Messung des LDH-Ausstroms aus Leberzellen

Um den Erfolg der Permeabilisierung von Leberzellen zu überprüfen, wurde der LDH-Ausstrom in den Inkubationspuffer gemessen. Nach 10 min Inkubation der Hepatozyten in permeabilisierenden Detergentien wurden die Zellen in der Hettich Zentrifuge abzentrifugiert, das zellfreie Medium abpipettiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Bestimmung der LDH-Aktivität im Puffer erfolgte nach der Methode von Bergmeyer und Bernt (9). In Glasküvetten wurden pipettiert: 245 μl TRAM/EDTA-Puffer (100 mM TRAM, 10 mM EDTA, pH 7,6), 10 μl Probe 1:20 verdünnt, 10 μl NADH (10mg/ml). Die Reaktion wurde mit 5 μl 30 mM Pyruvat gestartet. Die Änderung der Extinktion wurde bei 334 nm am Eppendorf Photometer verfolgt.

2.2.14. Messung der (1-¹⁴C)-Glukoseoxidation

Die Methode der (1-¹⁴C)-Glukoseoxidation ist modifiziert nach der von Siess et al. (106) und May und DeHaën (79) beschriebenen Methode der (U-¹⁴C)-Glukoseoxidation. In großen Polyethylenröhrchen wurden 1,7 ml 2,5% BSA-HEPES-Puffer und 0,3 ml Fettzellen gegeben. Kalte Glukose wurde in einer Endkonzentration von 0,1 mM, (1-¹⁴C)-Glukose in einer Konzentration von 0,1 uCi/ml zugegeben. Die Inkubation wurde nach Zugabe von Puffer, Inkubationszusätzen und Zellen durch Zugabe der (1-¹⁴C)-Glukose gestartet. Die Gefäße wurden sofort durch eine Gummikappe verschlossen und 15 min bei 37°C im Schüttelwasserbad bei 50 Anschlägen/min inkubiert. Inkubationsstopp erfolgte durch Injektion von 0,5 ml 8 N H₂SO₄ in den Inkubationsansatz durch den luftdicht schließenden Gummi. Die Proben blieben nun 10 min im Eiskochsalzbad stehen. Danach wurden 250 µl Phenylethylamin in ein an der Unterseite der Gummikappe aufgehängtes Plastiktöpfchen injiziert. Nach einer Stunde Stehen bei Zimmertemperatur wurde die Gummikappe abgenommen, das Töpfchen wurde mit dem Phenylethylamin in ein mit 10 ml Szintillationsgel gefülltes Szintillationsgefäß gegeben. Radioaktivität wurde nach Auflösen der Töpfchen im Szintillationsgel (nach ca. 12 h) im Szintillationszähler gemessen. Als Bezugsgröße wurden 20 µl der (1-¹⁴C)-Glukose in Szintillationsgel mitgeführt.

2.2.15. Formiatoxidation nach DeHaën (79)

Der Versuchsaufbau und die -Durchführung glichen der Glukose-oxidation. Zu einem Inkubationsansatz von 1,7 ml 2,5% BSA-HEPES-Puffer und 0,3 ml Fettzellen wurden zum Start der Inkubation 20 μ l Formiatgemisch (20 mM Na-Formiat, 18 μ Ci/ml 14 C-Formiat) zugegeben. Nach 15 min Inkubation erfolgte der Stopp durch Injektion von 0,5 ml Citronensäurepuffer (1 M Citronensäure + 0,5% Na-Acetat, pH 5,5). Das weitere Vorgehen ist das selbe wie bei der Glukoseoxidation.

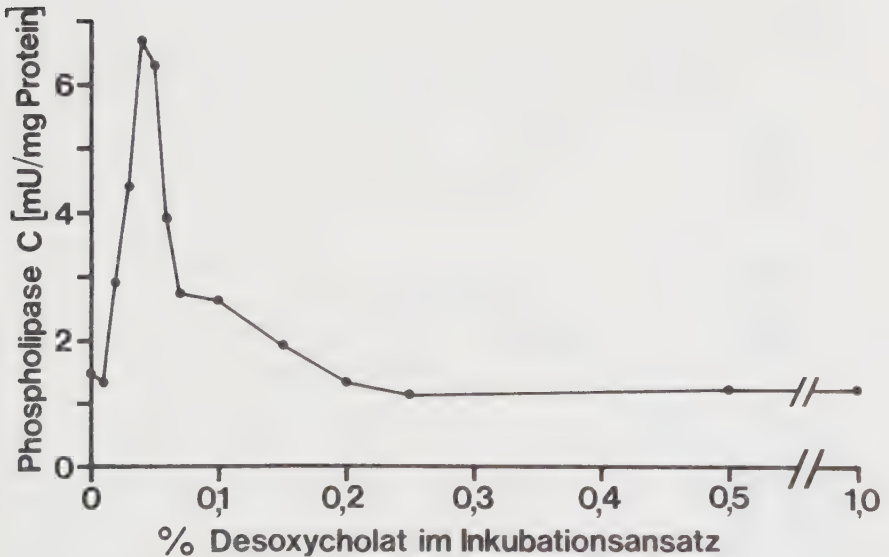
3. ERGEBNISSE

3.1. VERSUCHE ZUR MESSUNG DER PHOSPHOLIPASE-C AN ERYTHROZYTEN- GHOSTS

3.1.1. Abhängigkeit der Phospholipase-C-Aktivität von der Desoxycholatkonzentration

In folgenden Versuchen sollte die optimale Desoxycholatkonzentration im Inkubationsansatz herausgefunden werden. Die Inkubationen wurden wie in 2.2.11.1 durchgeführt. Der Proteingehalt betrug 150 µg im Inkubationsansatz.

Abb. 3: Abhängigkeit der Phospholipase-C-Aktivität von der Desoxycholatkonzentration



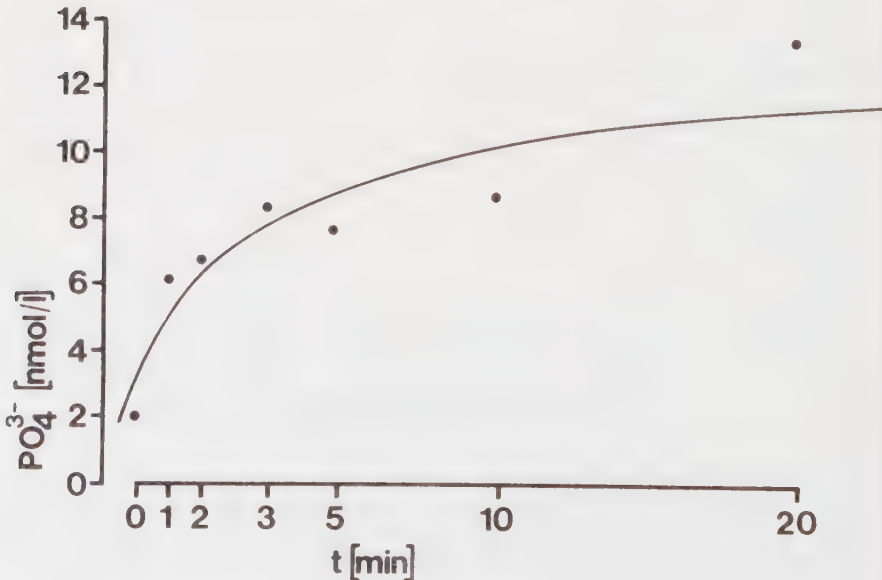
Inkubiert wurden: 50 µl Erythrozytenghostsuspension, 10 µl 11 mM CaCl₂, 10 µl PI (10 mg/ml), 10 µl Desoxychololverdünnung, je nach gewünschter Konzentration im Ansatz, 30 µl 50 mM Tris/Maleat pH 7,4. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei Versuchen.

Es ließ sich ein deutliches Aktivitätsmaximum bei einer Desoxycholatkonzentration von 0,05% zeigen. Die maximale Aktivität war auf einen sehr schmalen Konzentrationsbereich begrenzt. Dieser Befund deckt sich mit dem von Lenstra et al. (67), die die Desoxycholatabhängigkeit der Phospholipase-C an Thrombozyten untersuchten und ein scharf begrenztes Aktivitätsmaximum bei 0,1% fanden. In den folgenden Versuchen wurde eine Desoxycholatkonzentration von 0,05% gewählt.

3.1.2. Zeitabhängigkeit der Erythrozyten-Phospholipase-C

Es wurden verschiedene Inkubationszeiten zwischen 1 und 20 min gewählt. Die Inkubationsbedingungen waren diesselben, wie in 3.1.1., es wurde lediglich eine für alle Ansätze gleiche Desoxycholatkonzentration von 0,05% gewählt. Die Ergebnisse aus zwei Versuchen sind in Abbildung 4 dargestellt.

Abb. 4: Abhängigkeit der Phosphatkonzentration von der Inkubationszeit der Erythrozytenghosts mit PI



Inkubationsansatz: Erythrozytenghosts mit 150 µg Protein , 0,05% Desoxycholat, 1 mM CaCl₂, 0,1 mg PI in 50 mM Tris/Maleat pH 7,4.

Bei Inkubationszeiten bis zu drei Minuten läßt sich ein steiler Anstieg der Phospholipase-C-Aktivität beobachten, der sich danach deutlich verlangsamt. Als Inkubationszeit für die folgenden Versuche wurde eine Inkubationszeit von 10 min gewählt.

3.1.3. Inkubation von Erythrozytenghosts mit Insulin

In zwei verschiedenen Versuchen wurden Erythrozytenghosts mit Insulin inkubiert, um die Insulinstimulierbarkeit der membranständigen Phospholipase-C zu untersuchen. Es wurden zum einen Ghosts mit einer Insulinkonzentration von 100 µU/ml inkubiert; Aktivität der Phospholipase-C wurde nach einer, sowie nach 10 min Inkubationszeit bestimmt. Eine Insulinkonzentration von 100 µU/ml wirkt bei einer Inkubationszeit von 10 min auf die Phospholipase-C der Fettzellen maximal stimulierend (61). Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Inkubation von Erythrozytenghosts mit- und ohne Insulin

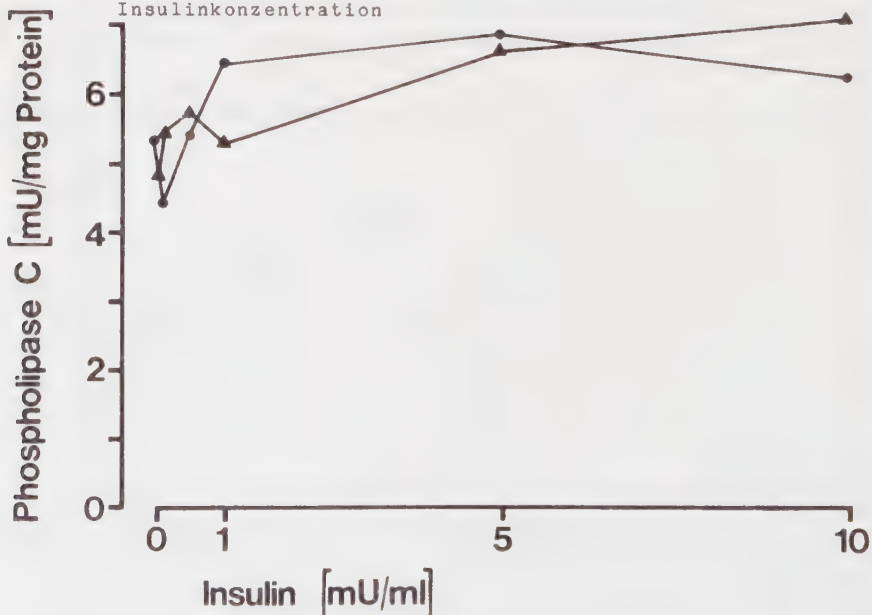
	PO ₄ ³⁻ (nmol/l)	
	Inkubations- zeit 1 min	Inkubations- zeit 10 min
Kontrolle	1,80	2,16
Ghosts ohne Insulin	4,78	8,17
Ghosts mit 100 µU/ml Insulin	5,34	9,25

Inkubationsbedingungen wie unter 3.1.2.. Inkubationsansätze:
Kontrolle: Ghosts mit 150 μg Protein, 1 mM EGTA in 50 mM Tris/Maleat pH 7,4. Ghosts ohne Insulin: Ghosts mit 150 μg Protein, 1 mM CaCl_2 , 0,05% Desoxycholat, 0,1 mg PI in 50 mM Tris/Maleat pH 7,4. Ghosts mit 100 $\mu\text{U/ml}$ Insulin: zusätzlich 100 $\mu\text{U/ml}$ Insulin.

Zwischen insulinfrei inkubierten Ghosts und mit 100 $\mu\text{U/ml}$ Insulin inkubierten Ghosts lässt sich kein wesentlicher Unterschied in der Phospholipase-C-Aktivität erkennen. Dies gilt für 1 min Inkubationszeit sowie für die Inkubationszeit von 10 min.

In einem weiteren Versuch wurden Erythrozytenghosts mit verschiedenen Insulinkonzentrationen von 100 $\mu\text{U/ml}$ bis 10 mU/ml inkubiert. Im Vergleich zu insulinfrei inkubierten Ghosts ergab sich auch hier keine Stimulierung der Phospholipase-C durch Insulin. Nicht einmal das Hundertfache der an Fettzellen maximal stimulierenden Konzentration bewirkte hier eine Aktivitätssteigerung.

Abb. 5: Abhängigkeit der Phospholipase-C-Aktivität von der Insulinkonzentration



Inkubationsbedingungen: ▲ Proben ohne Insulin: Ghosts mit 150 µg Protein, 1 mM CaCl_2 , 0,05% Desoxycholat, 0,1 mg PI in 50 mM Tris/Maleat pH 7,4. ● Proben mit Insulin: genauso, zusätzlich 10 µl einer Insulinverdünnung mit der 11-fachen Konzentration der gewünschten Endkonzentration. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch.

Die Aktivitäten der Phospholipase-C liegen in diesem Versuch im selben Bereich wie im vorangegangenen Versuch. Mittelt man die Aktivitäten aller Inkubationsansätze mit Insulin bzw. insulinfreier Kontrollen ergibt sich folgendes Bild:

Tab. 2: Wirkung von Insulin auf die Phospholipase-C am Erythrozyten

kein Insulin		mit Insulin (100 uU/ml)	
Aktivität	5,66 ± 0,25	5,85 ± 0,32	
(mU/mg Protein)	n=8	n=6	
p > 0,5			

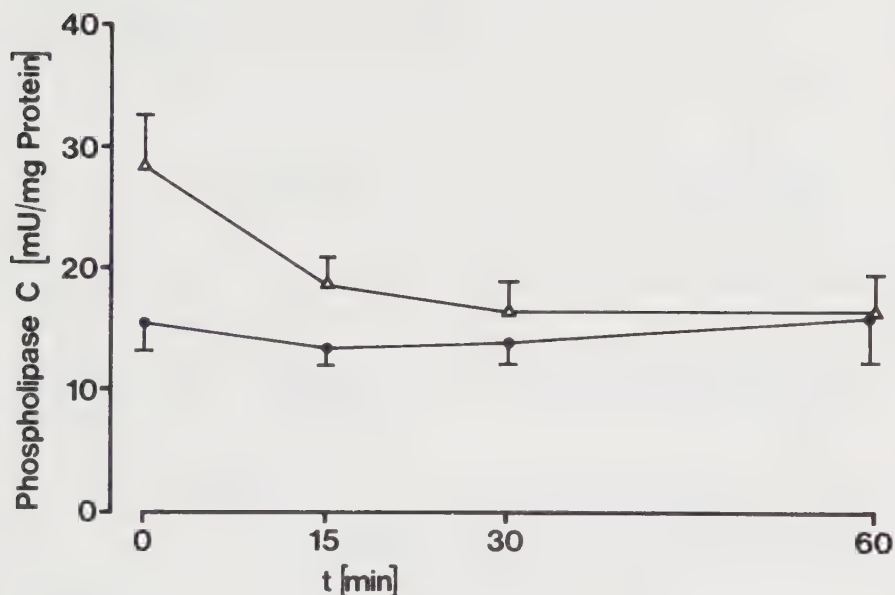
3.2. VERSUCHE ZUM MECHANISMUS DER INSULINAKTIVIERUNG DER PHOSPHOLIPASE-C AN FETTZELLEN

In den folgenden Versuchen wurde die von Köpfer-Hobelsberger und Wieland (61) beschriebene Aktivierung der Phospholipase-C durch Insulin in Bezug auf Reversibilität und Stabilisierung untersucht.

3.2.1. Reversibilität der Insulinaktivierung der Phospholipase-C

Homogenate von insulininkubierten Fettzellen sowie von insulinfrei inkubierten Kontrollen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, hergestellt. Um zu sehen, ob die Insulinaktivierung des Enzyms reversibel ist, wurden die Homogenate bei 37°C im Wärmeblock aufbewahrt und zu den in Abbildung 6 auf der Abszisse genannten Zeiten die Phospholipase-C-Aktivitäten gemessen.

Abb. 6: Reversibilität der Insulinaktivierung der Phospholipase-C



Phospholipase-C-Bestimmung nach 2.2.11.1 und 2.2.11.2.. Abszisse: Aufbewahrung der Homogenate bei 37°C in min. Ordinate: Phospholipase-C-Aktivität. Dargestellt sind die Aktivitäten der nicht mit Insulin inkubierten Kontrollen (●) und der für 10 min mit 100 μ U/ml Insulin inkubierten Proben (Δ). Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 19 Versuchen.

Die Stimulierung der Phospholipase-C durch Insulin um das 1,8-fache stimmt mit den Beobachtungen von Köpfer-Hobelsberger und Wieland (61) überein; ebenso der an der PDH gleichzeitig bestimmte Insulineffekt, der eine 2,4-fache Stimulierung der PDH zeigte. Nach 15 min Inkubation der Homogenate ist die Phospholipase-C-Aktivität der insulinbehandelten Zellen um ca 30% zurückgegangen und nach 30 min ist gegenüber den Kontrollen ein signifikanter Unterschied nicht mehr feststellbar ($p > 0,5$).

Diese Ergebnisse sind mit der Vorstellung vereinbar, daß die Aktivierung und Inaktivierung der Phospholipase-C durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Enzyms erfolgt. Es wurde deshalb der Effekt bekannter Phosphoprotein-Phosphatasehemmer, wie Vanadat und NaF auf den Verlauf der Inaktivierungsgeschwindigkeit untersucht.

3.2.2. Einfluß von Na-Vanadat auf die Phospholipase-C-Inaktivierung

Fettzellhomogenate von insulininkubierten Zellen und insulinfrei inkubierten Kontrollen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, hergestellt. Die Hälfte der Homogenate wurde mit 10 mM Na-Vanadat versetzt, die andere Hälfte der Homogenate diente als vana-datfreie Kontrolle. Der Versuchsaufbau war der gleiche wie in 3.2.1.

Tab. 3: Einfluß von 10 mM Na-Vanadat auf die Haltbarkeit der Insulinaktivierung der Phospholipase-C

Homogenat	Inkubation bei 37°C (min)	Phospholipase-C (mU/mg Protein)	
		ohne Vanadat	10 mM Vanadat
Kontrolle	0	14,7 ± 4,2	7,0 ± 3,1
Insulin	0	19,8 ± 3,7	5,5 ± 0,8
Kontrolle	15	11,6 ± 2,6	9,8 ± 3,1
Insulin	15	17,7 ± 3,2	10,7 ± 2,7
Kontrolle	30	10,2 ± 2,7	6,6 ± 2,6
Insulin	30	7,9 ± 1,8	8,3 ± 2,1
Kontrolle	60	17,2 ± 6,5	9,1 ± 3,3
Insulin	60	14,4 ± 3,2	6,0 ± 3,0

Fettzellhomogenate ohne Vanadat wurden wie in 3.2.1. hergestellt und behandelt. Homogenate mit Vanadat wurden durch Zugabe einer 1 M Na-Vanadat-Lösung so hergestellt, daß die Endkonzentration im Homogenat 10 mM betrug. Phospholipase-C-Bestimmung erfolgte nach den gleichen Inkubationszeiten bei 37°C wie in 3.2.1.. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 6 Versuchen.

Aus diesen Versuchen ist zu schließen, daß Na-Vanadat die Aktivität der Phospholipase-C deutlich hemmt, und zwar sowohl in den Proben mit Insulin, als auch in denen ohne Insulin. Diese durch Vanadat verursachte Hemmung der Phospholipase-C ist hochsignifikant ($p < 0,0005$). Die Frage, ob Vanadat die Inaktivierungsgeschwindigkeit der durch Insulin aktivierten Phospholipase-C hemmt, läßt sich deshalb aus diesen Versuchen nicht beantworten.

3.2.3. Einfluß von NaF auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit der Phospholipase-C

Diese Versuchsreihe wurde genauso durchgeführt, wie die in 3.2.2. beschriebene. Um eine Hemmung der Phospholipase-C durch zu hohe Konzentrationen NaF auszuschließen, wurde in einem Vorversuch zuerst die Abhängigkeit der Phospholipase-C-Aktivität von der NaF-Konzentration untersucht.

Dazu wurden Fettzellhomogenate von insulininkubierten Zellen und von insulinfrei inkubierten Kontrollen mit 10 mM und 20 mM NaF versetzt. Sofort im Anschluß daran wurde, wie in 2.2.11.1. beschrieben, die Phospholipase-C-Aktivität bestimmt. Aus fünf verschiedenen Präparationen ergab sich eine für den Versuch optimale NaF-Konzentration von 20 mM. Die Phospholipase-C-Aktivitäten betrugen hier für die Kontrollen $15,3 \pm 3,31$ mU/mg Protein, für die Homogenate der insulininkubierten Zellen $27,5 \pm 8,24$ mU/mg Protein. Die Aktivitäten der mit 10 mM NaF versetzten Homogenate lagen niedriger. Für die folgenden Versuche wurden 20 mM NaF eingesetzt.

Tab. 4: Einfluß von 20 mM NaF auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit der insulinaktivierten Phospholipase-C

Homogenat	Inkubation bei 37°C (min)	Phospholipase-C (mU/mg Protein)	
		ohne NaF	20 mM NaF
Kontrolle	0	19,5 $\pm$ 1,5	19,2 $\pm$ 2,3
Insulin	0	29,8 $\pm$ 4,8	33,0 $\pm$ 7,2
Kontrolle	15	21,5 $\pm$ 2,3	20,6 $\pm$ 2,8
Insulin	15	30,2 $\pm$ 6,3	31,7 $\pm$ 6,7
Kontrolle	30	17,1 $\pm$ 1,7	22,0 $\pm$ 3,7
Insulin	30	23,7 $\pm$ 3,8	22,2 $\pm$ 2,8
Kontrolle	60	17,7 $\pm$ 1,7	19,3 $\pm$ 3,3
Insulin	60	18,3 $\pm$ 2,5	22,4 $\pm$ 3,8

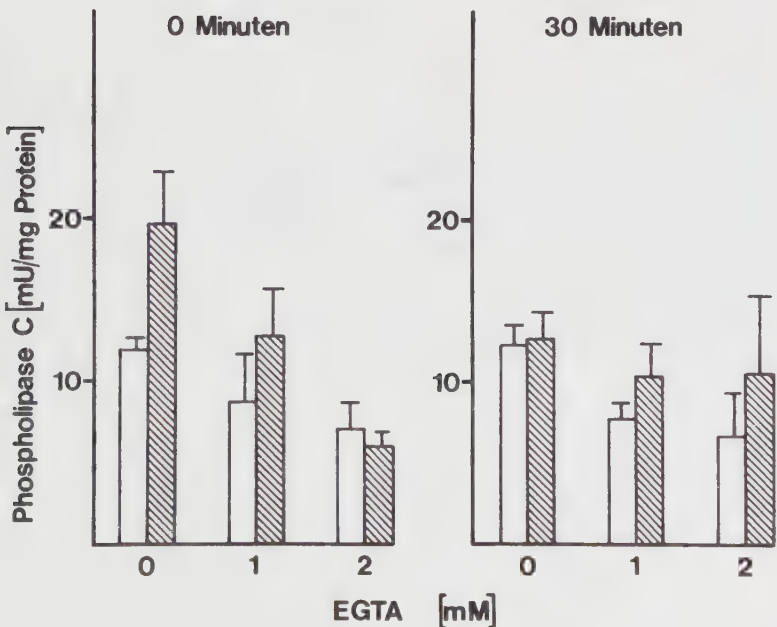
Versuchsaufbau und -Durchführung wie in 3.2.2..Homogenate mit NaF wurden durch Zugabe einer 1 M NaF-Lösung so hergestellt, daß die Endkonzentration im Homogenat 20 mM betrug. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 11 Versuchen.

NaF vermag die Insulinaktivierung der Phospholipase-C nicht zu stabilisieren. Die Reversibilität der Insulinaktivierung bleibt in beiden Fällen, mit- und ohne NaF, unbeeinflusst. Ein signifikanter Unterschied besteht nicht ($p > 0,5$). Eine Hemmung der Phospholipase-C-Aktivität, wie bei Na-Vanadat, kann nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse liefern keinen Anhalt für die Beteiligung einer fluordhemmbaren Phosphatase an der Inaktivierung der Phospholipase-C.

3.2.4. Einfluß von EGTA auf die Stabilität der Insulinaktivierung der Phospholipase-C

Diese Experimente sollten zeigen, ob Ca^{2+} - eventuell über Aktivierung einer Phosphoprotein-Phosphatase - in der Inaktivierung der insulinaktivierten Phospholipase-C essentiell ist. Wie nach 2.2.11.1. hergestellte Fettzellhomogenate wurden mit 1 mM und 2 mM EGTA versetzt. Kontrollhomogenate ohne EGTA wurden im Versuch mitgeführt. Von den Homogenaten wurde sofort und nach 30 min Stehen im Wärmeblock bei 37°C die Phospholipase-C-Aktivität bestimmt.

Abb. 7: Einfluß von EGTA auf die Phospholipase-C-Aktivität und auf die Stabilität des Insulineffektes



Fettzellen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, 10 min ohne (offene Balken) und mit 100 μ U/ml Insulin (schraffierte Balken) inkubiert und anschließend homogenisiert. Die Homogenate wurden nach Zusatz von EGTA 30 min inkubiert und die Phospholipase-C-Aktivität nach Zugabe von 1 mM CaCl_2 bestimmt (s. 2.2.11.1.). Das linke Bild zeigt die Phospholipase-C-Aktivitäten der Homogenate bei 37°C zur Zeit 0 min, das rechte Bild die Aktivitäten nach 30 min. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 4 Versuchen.

Auch EGTA vermag die Phospholipase-C im insulinaktivierten Zustand nicht länger als in den Kontrollen zu erhalten. Sofort der Phospholipase-C-Bestimmung zugeführte Homogenate ohne EGTA zeigen die zu erwartende Stimulierung der Phospholipase-C durch Insulin (1,7-fach). Mit steigender EGTA-Konzentration nimmt die Phospholipase-C-Aktivität sowohl für die Zellaufschlüsse insulinbehandelter Zellen, als auch für die Kontrollen ab. Bei EGTA-Konzentrationen von 2 mM im Homogenat ist kein Aktivitätsunterschied zwischen Kontrollen und insulinbehandelten Zellen mehr feststellbar. Nach Aufbewahren der Homogenate für 30 min bei 37°C ist die Aktivierung der Phospholipase-C durch Insulin verschwunden, wie schon in 3.2.1. gezeigt wurde. Auch bei steigenden Konzentrationen EGTA ließ sich also die Reversibilität der Insulinaktivierung der Phospholipase-C nicht unterbinden. Bei allen EGTA-Konzentrationen war der Unterschied der Aktivitäten zwischen Homogenaten insulininkubierter Zellen und insulinfreien Kontrollen nach 30 min Aufbewahren der Proben bei 37°C nicht signifikant ($p > 0,5$).

3.2.5. Versuche zur Stimulierbarkeit der Phospholipase-C durch ATP

Diese Versuche galten ebenfalls der Frage, ob die Aktivierung der Phospholipase-C durch Insulin auf Phosphorylierung des Enzyms beruht. Fettzellhomogenate wurden deshalb mit ATP inkubiert und nach verschiedenen Inkubationszeiten die Phospholipase-C-Aktivitäten bestimmt. Wegen der Anwesenheit von ATP im Inkubationsansatz war die Phospholipase-C-Bestimmung mit dem colorimetrischen Phosphatetest nach Rouser (100) nicht möglich. Phospholipase-C-Bestimmung erfolgte daher, wie in 2.2.11.3. beschrieben, mit ^3H -markiertem PI als Substrat.

Für die folgenden Versuche wurden 60 μl Einsatz an Homogenat für den Inkubationsansatz gewählt (entsprechend ca. 40 μg Protein), da in einem Bereich von 30-55 μg Protein im Inkubationsansatz die spezifische Aktivität des Enzyms konstant blieb.

Die Versuche zur Stimulierbarkeit der Phospholipase-C durch ATP wurden folgendermaßen durchgeführt:

Fettzellen wurden ohne vorausgegangene Insulininkubation homogenisiert, die Homogenate wurden in drei Ansätze aufgeteilt. Der erste Ansatz bestand aus einer zusatzfreien Kontrolle. Dem zweiten Ansatz wurde ATP in einer Endkonzentration von 5 mM und MgCl_2 in einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Ansatz drei enthielt die selben Mengen ATP und MgCl_2 . Zur Stabilisierung des ATP wurde als Phosphatasehemmer NaF in einer Endkonzentration von 20 mM zusätzlich zugegeben. Die so behandelten Homogenate wurden bei 37°C gehalten. Phospholipase-C-Aktivität wurde sofort, nach 10, 20 und 30 min Inkubation bei 37°C bestimmt.

Tab. 5: Nichtstimulierbarkeit der Phospholipase-C durch ATP

Phospholipase-C (mU/mg Protein)			
Inkubation bei 37°C (min)	Kontrolle	5 mM ATP 2 mM MgCl ₂	5 mM ATP 2 mM MgCl ₂ 20 mM NaF
0	110,7 ± 14,1	99,1 ± 16,7	86,1 ± 13,0
10	108,4 ± 15,4	98,1 ± 13,3	78,4 ± 10,5
20	97,7 ± 17,1	93,2 ± 16,5	85,6 ± 12,0
30	99,4 ± 16,9	97,8 ± 17,7	79,6 ± 18,1

Fettzellhomogenate wurden, wie im Methodenteil beschrieben, hergestellt. 0,5 ml Homogenat wurden mit je 10 µl 265 mM ATP, 106 mM MgCl₂ und 1,06 M NaF versetzt. Bei den Kontrollen und den Homogenaten ohne NaF wurden die Volumina entsprechend durch 50 mM Tris/Maleat pH 7,4 ausgeglichen. Phospholipase-C-Bestimmung erfolgte wie in 2.2.11.3.. Mittelwerte ± S.E.M. aus 7 Versuchen.

Wie in Tabelle 5 zu sehen ist, läßt sich Phospholipase-C der Fettzellen nicht durch ATP aktivieren. Zusatz von ATP ändert die Phospholipase-C-Aktivität nicht, wie die sofortige (t=0 Min) Phospholipase-C-Bestimmung der mit ATP versetzten Homogenate zeigt. Auch bei Inkubationszeiten der Homogenate mit ATP bis zu 30 min vermag ATP die Phospholipase-C nicht zu aktivieren. Zwischen allen drei Ansätzen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Die spezifische Aktivität der Phospholipase-C liegt in Versuchen mit ³H-markiertem PI höher, als in Versuchen, in denen die Phospholipase-C-Bestimmung mittels colorimetrischer Phosphatbestimmung (100) durchgeführt wurde. Dies mag daran liegen, daß der ³H-Inosit-Nachweis empfindlicher ist.

3.2.6. Versuche an Fettzellmembranen

Um festzustellen, ob Fettzellmembranen überhaupt Phospholipase-C Aktivität zeigen, wurde nach Zentrifugation von Fettzellhomogenaten die Phospholipase-C-Aktivität im wässrigen Überstand sowie im aus festen Zellbestandteilen bestehenden Pellet gemessen.

Tab. 6: Aktivitätsverteilung der Phospholipase-C zwischen Cytosol und festen Bestandteilen der Fettzellen

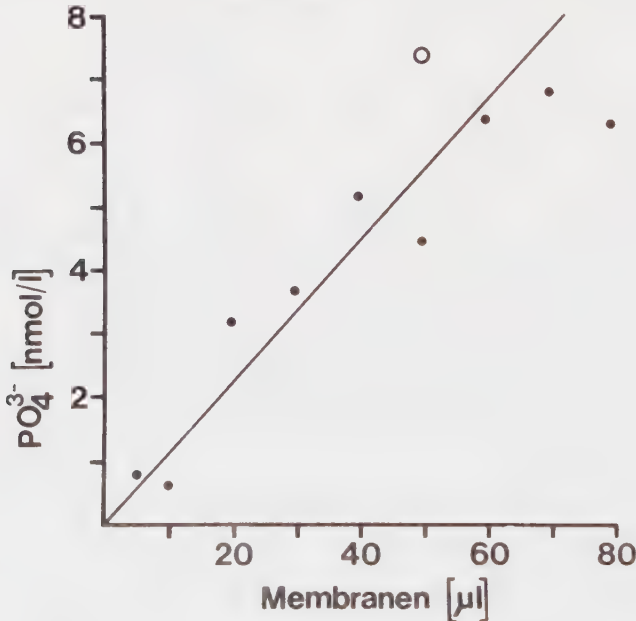
	Cytosol	feste Zellbestandteile
Phospholipase-C (mU/mg Protein)	52,1 $\pm$ 12,9	23,4 $\pm$ 4,8
Protein (mg/ml)	1,23 $\pm$ 0,03	1,23 $\pm$ 0,10

Fettzellhomogenate wurden wie in 2.2.5. hergestellt. Anschließend wurden die Homogenate in Cups bei 4°C 2,5 min bei 16000 Xg in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase (Cytosol) wurde daraufhin mit einer Spritze abgesaugt und bis zur Phospholipase-C-Bestimmung in flüssigem N₂ tiefgefroren. Das Pellet wurde vorsichtig mit 200 µl 50 mM Tris/Maleat pH 7,4 resuspendiert und in einem 1 ml Glaspotter dreimal gepottert. Phospholipase-C-Bestimmung erfolgte wie in 2.2.11.3. beschrieben. Mittelwerte + S.E.M. aus drei Versuchen.

Bei vergleichbaren Proteinkonzentrationen fand sich im Cytosol etwa die doppelte Phospholipase-C-Aktivität wie in den Membranen. Dies kann daran liegen, daß die Fettzellmembran weniger Enzym als das Cytosol enthält. Zum anderen könnte die Phospholipase-C aufgrund ihrer Lokalisation in der Membran weniger gut mit dem exogen zugeführten Substrat in Verbindung treten und somit niedrigere Aktivitäten zeigen. Es fand sich bei diesen

Versuchen jedoch genügend hohe Phospholipase-C-Aktivität in den festen Zellbestandteilen, so daß in den folgenden Versuchen, um Verunreinigungen zu vermeiden und eine quantitativ höhere Ausbeute an Membranen zu erhalten, Fettzellmembranen mit der in 2.2.6. beschriebenen Methode isoliert wurden. In einem Vorversuch wurde die Proteinabhängigkeit der membranständigen Phospholipase-C ermittelt.

Abb. 8: Proteinabhängigkeit der Phospholipase-C aus Fettzellmembranen

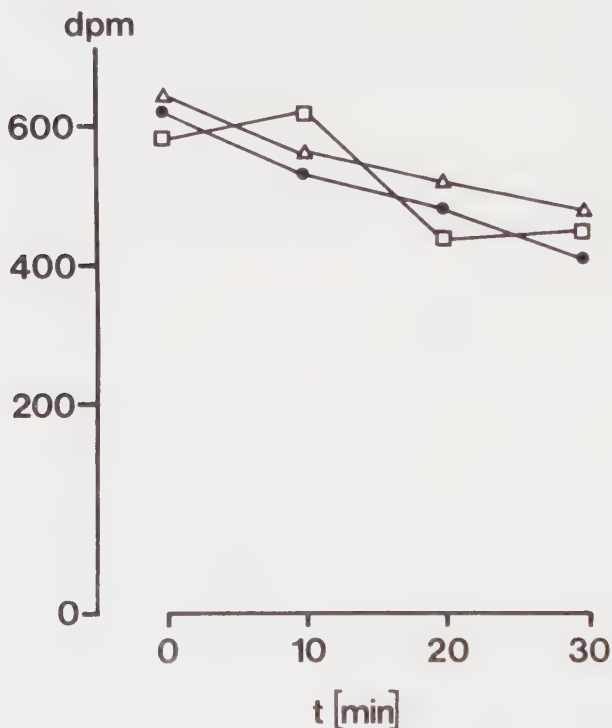


Fettzellmembranen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation, wie in 2.2.6. beschrieben, hergestellt. Phospholipase-C-Aktivitätsbestimmung erfolgte wie in 2.2.11.3.. Im Inkubationsansatz wurden die auf der Abszisse aufgeführten Volumina an Membranen inkubiert; das Volumen des Inkubationsansatzes wurde auf 110 μ l ausgeglichen. Der offene Kreis zeigt einen Inkubationsansatz mit 15 sec durch Ultraschall behandelten Membranen. Der Proteingehalt der Membranen betrug 102 μ g/ml.

Sodann wurde untersucht, ob möglicherweise nur die membranständige Phospholipase-C durch ATP aktiviert wird. Dabei wurde wie in 3.2.5. vorgegangen. Von der Fettzellmembransuspension wurden Ansätze mit 5 mM ATP und 2 mM $MgCl_2$, sowie Ansätze mit gleichem ATP- und $MgCl_2$ -Gehalt und zusätzlich 20 mM NaF hergestellt. Zusatzfreie Kontrollen wurden mitgeführt. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse eines typischen Versuches.

Ebenso wie die cytosolische Phospholipase-C der Fettzellen, ist demnach die membranständige Phospholipase-C durch ATP nicht stimulierbar.

Abb. 9: Nichtstimulierbarkeit der Phospholipase-C aus Fettzellmembranen durch ATP



Fettzellmembranen wurden, wie in 2.2.6. beschrieben, hergestellt. Versuchsaufbau und -Durchführung wie in 3.2.5.. Proteingehalt der Membranen 650 µg/ml. Die Membransuspension wurde 15 sec mit dem Labsonic Dismembrator ultraschallbehandelt. Herstellung der verschiedenen Inkubationsansätze mit und ohne ATP s. 3.2.5.. Inkubationsansätze zur Phospholipase-C-Bestimmung enthielten 20 µl Membransuspension. Phospholipase-C-Bestimmung wie in 2.2.11.3... ● Kontrollen; □ Membranen mit 5 mM ATP und 2 mM MgCl₂; Δ Membranen mit ATP und MgCl₂ sowie 20 mM NaF.

3.3. VERSUCHE ZUR STIMULIERBARKEIT DER LEBERZELL-PDH DURCH INOSITPHOSPHATE

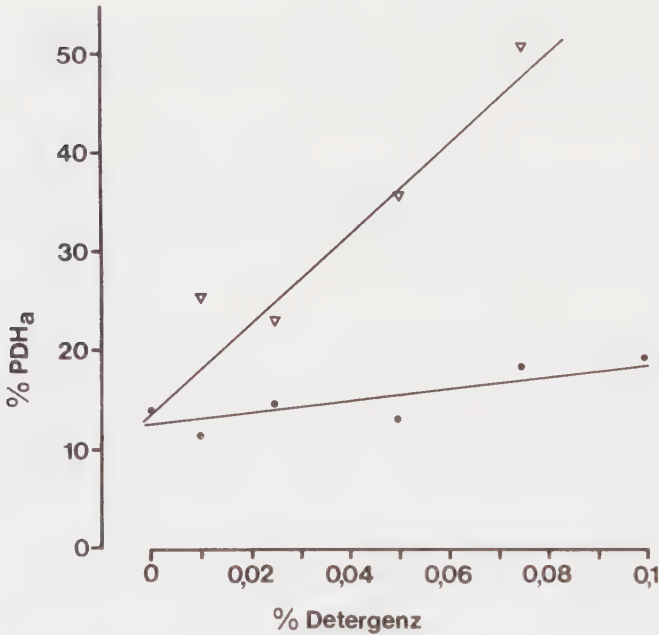
Nachdem Köpfer-Hobelsberger und Wieland (62) zeigen konnten, daß IP_3 die Fettzell-PDH zu stimulieren vermag, wurden ähnliche Versuche an Leberzellen unternommen.

3.3.1. Permeabilisierung von Hepatozyten mit Digitonin und Saponin - Überprüfung der erfolgten Permeabilisierung durch Messung des LDH-Ausstromes

Da die Zellmembran für Inositphosphate nicht durchlässig ist, müssen die Zellen vor der Inkubation mit Inositphosphaten permeabilisiert werden. In diesem Versuch sollte die optimale Konzentration an permeabilisierendem Detergenz gefunden werden. Außerdem sollten Digitonin und Saponin in ihren Eigenschaften als permeabilisierende Agentien und ihr Einfluß auf die PDH verglichen werden.

Präparation isolierter Hepatozyten erfolgte nach der Methode von Berry und Friend (14)(s. 2.2.9.). Die Leberzellen wurden, wie in 2.2.10. beschrieben, mit verschiedenen Mengen Digitonin oder Saponin inkubiert.

Abb.10: Abhängigkeit der PDH-Aktivität von der Digitonin- bzw. Saponin-Konzentration



Nach 2.2.9. präparierte Hepatozyten wurden wie in 2.2.10. inkubiert. Inkubationsansätze: 0,5 ml Zellen und 4,5 ml Ca^{2+} -freier BSA-Puffer wurden in großen Polyethylenröhrchen mit der gewünschten Menge Detergenz 10 min inkubiert. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 0-0,1% Detergenz im Inkubationsansatz gewählt. Es wurden verschiedene Mengen einer 10% Detergenz-Lösung den Inkubationsansätzen zugegeben. ▽ Proben mit Saponin; ● Proben mit Digitonin. PDH-Aktivität wurde wie in 2.2.12. bestimmt.

Bei steigenden Mengen Digitonin im Inkubationsansatz steigt die PDH-Aktivität leicht an, was sich durch die zunehmende Zerstörung der Membran unter höheren Konzentrationen Detergenz erklären ließe, die ihrerseits zu intrazellulären Gradientenänderungen führt. In diesem Falle könnten besonders Änderungen des Calcium-, Magnesium- und ATP-Spiegels eine Rolle spielen (122). Für Saponin ist die Zunahme der PDH-Spontanaktivität mit steigender Konzentration viel stärker ausgeprägt.

Zur Überprüfung der Effektivität der Permeabilisierung wurde der LDH-Ausstrom aus permeabilisierten Leberzellen gemessen. Leberzellen wurden dazu, wie oben, mit verschiedenen Konzentrationen Digitonin oder Saponin inkubiert. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurde die LDH-Aktivität im Inkubationspuffer gemessen. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse aus zwei Versuchen.

Tab. 7: LDH-Ausstrom aus permeabilisierten Leberzellen

Detergenz im Inkubationsansatz	LDH (U/l)	= % der Gesamt- aktivität
Kontrolle	4,6	58,2
0,01% Digitonin	7,1	89,9
0,025% Digitonin	7,2	91,1
0,1% Digitonin	6,9	87,3
0,005% Saponin	7,1	89,9
0,01% Saponin	7,9	100,0
0,025% Saponin	7,6	96,2
Leberzellhomogenat	7,9	100,0

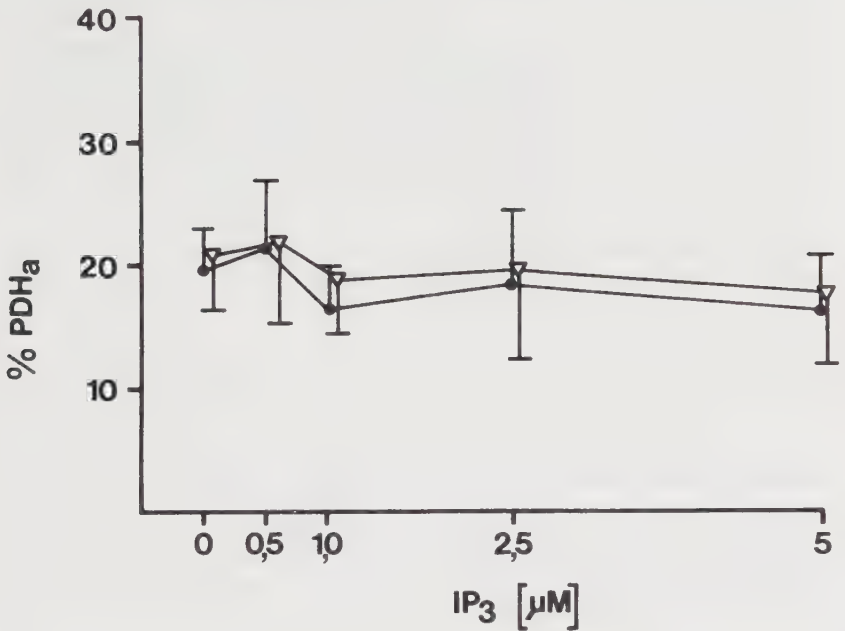
Herstellung der isolierten Hepatozyten und deren Inkubation siehe Methodenteil. Inkubationsansatz: 100 μ l Zellen in 900 μ l Ca^{2+} -freiem BSA-Puffer, zusätzlich die gewünschte Menge Detergenz. Bestimmung der LDH-Aktivität siehe Methodenteil. Als Maß für die Gesamtaktivität wurden 100 μ l Zellen in 900 μ l Puffer 2 x 20 sec im Ultra-Turrax homogenisiert, das Homogenat 2 min in der Eppendorf Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert und aus dem Überstand die LDH-Aktivität bestimmt. Eine detergentenfreie Kontrolle wurde ebenfalls mitgeführt.

Schon mit 0,01% Digitonin bzw. 0,005% Saponin läßt sich eine gute Permeabilisierung der Hepatozyten erreichen, der LDH-Ausstrom betrug fast 90% der Gesamtaktivität und ließ sich durch höhere Konzentrationen an Detergenz nicht wesentlich steigern. Unpermeabilisierte Leberzellen zeigten einen deutlich niedrigeren LDH-Ausstrom. Für die nun folgenden Versuche wurde Digitonin zum Permeabilisieren in einer Konzentration von 0,025% im Inkubationsansatz gewählt.

3.3.2. Versuche zur Stimulierung der Leberzell-PDH mit verschiedenen Mengen IP_3

Hepatozyten wurden mit verschiedenen Mengen IP_3 inkubiert. Die Zellen waren mit 0,025% Digitonin permeabilisiert. Als Kontrollen wurden Parallelansätze an unpermeabilisierten Zellen durchgeführt. Außerdem wurden zur Kontrolle der Stimulierbarkeit der PDH Inkubationen mit einer die PDH stimulierenden Dosis von 1 mM CaCl_2 mitgeführt.

Abb. 11: Einfluß von verschiedenen Mengen IP_3 auf die Spontanaktivität der Leberzell-PDH



Herstellung und Inkubation der Hepatozyten siehe Methodenteil. Die Zellen wurden 10 min mit verschiedenen Mengen IP_3 inkubiert, danach homogenisiert. PDH_a und PDH -Gesamtaktivität wurden, wie im Methodenteil beschrieben, bestimmt. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 3 Versuchen. ● Kontrollen; ▼ Proben mit 0,025% Digitonin.

IP₃ vermag in Konzentrationen bis zu 5 µM die Leberzell-PDH nicht zu stimulieren. Es fand sich kein Unterschied in der PDH-Spontanaktivität zwischen den Kontrollen und den permeabilisierten, mit IP₃ inkubierten Zellen. Konzentrationen von 5 µM IP₃ vermögen die Fettzell-PDH schon maximal zu stimulieren (62). Auch Versuche, in denen anstelle des Digitonins Saponin in einer Konzentration von 0,005% zur Permeabilisierung gewählt wurde, brachten die selben Ergebnisse. Die Zellen reagierten auf eine stimulierende Dosis von 1 mM CaCl₂ im Inkubationsansatz mit einer PDH-Aktivierung auf 39,4% PDH_a bei unpermeabilisierten Zellen und auf 50,2% PDH_a bei mit Digitonin permeabilisierten.

3.3.3. Versuche zur Stimulierung der Leberzell-PDH mit IP₂

In diesen Versuchen wurde IP₂, das freundlicherweise von R.F. Irvine, Cambridge, England zur Verfügung gestellt wurde, in einer Konzentration von 2,5 µM bei der Inkubation von Hepatozyten eingesetzt. Diese Konzentration wirkte in Vorversuchen stimulierend auf die PDH bei Fettzellen. Der Versuchsaufbau und die -Durchführung entsprach den Bedingungen in 3.3.2.

Tab. 8: Einfluß von 2,5 µM IP₂ auf die Spontanaktivität der Leberzell-PDH

		% PDH _a
		Kontrollen
		0,025% Digitonin
ohne	IP ₂	12,8 ± 2,2
		13,8 ± 4,0
2,5 µM	IP ₂	18,4 ± 3,6
		11,3 ± 0,6
mit 1 mM	CaCl ₂	41,7 ± 9,0
stimuliert		60,0 ± 4,6

Herstellung und Inkubation der Hepatozyten siehe Methodenteil.
Versuchsdurchführung wie in 3.3.2.. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 3
Versuchen.

Auch IP_2 kann demnach die Leberzell-PDH nicht stimulieren.
Dagegen ließ sich die PDH durch eine stimulierende Dosis von
1 mM $CaCl_2$ gut aktivieren. Permeabilisierung der Hepatozyten
durch Saponin brachte die selben Ergebnisse.

3.4. VERSUCHE ZU INSULINÄHNLICHEN WIRKUNGEN VON PHORBOLESTERN AN FETTZELLEN

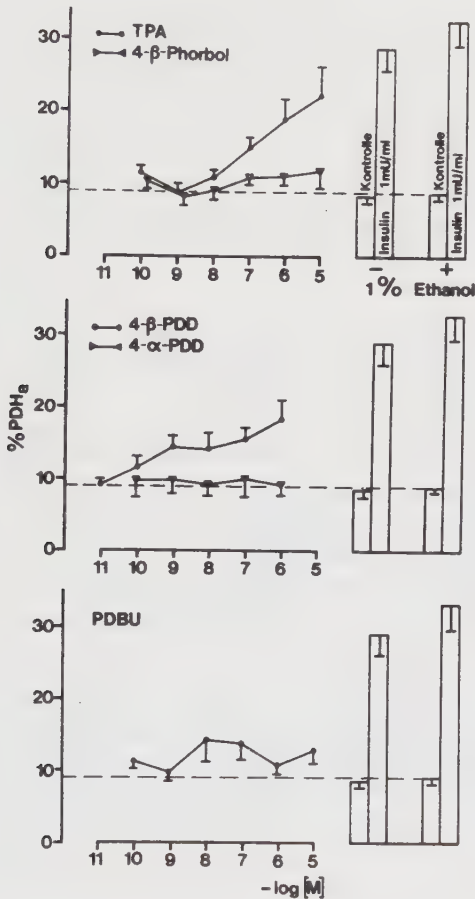
In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob Phorbolester als Stimulatoren der Proteinkinase-C an Fettzellen insulinähnliche Wirkungen hervorrufen können. Es sollte damit Aufschluß über eine mögliche Beteiligung des DAG-Messengerschenkels an der Übermittlung des Insulinsignals gewonnen werden.

3.4.1. Versuche zur Stimulierbarkeit der Fettzell-PDH durch verschiedene Mengen verschiedener Phorbolester

In diesen Versuchen wurde der Einfluß verschiedener Phorbolester auf die PDH studiert und mit dem bekannten, stimulierenden Einfluß von Insulin auf die PDH verglichen. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, ob Proteinkinase-C an der Aktivierung der PDH beteiligt ist. Stimulierung der Muskelzell-PDH durch den Phorbolester TPA wurde kürzlich von Farese et al. (38) beschrieben.

Fettzellen wurden, wie in 2.2.2. beschrieben, hergestellt. Sodann wurden die Adipozyten mit verschiedenen Mengen an Phorbolestern in einem Konzentrationsbereich von 0,01 nM bis 10 μ M inkubiert. Da die Phorbolester in Ethanol gelöst vorlagen, wurden Kontrollinkubationen ohne Phorbolester, aber mit Ethanol durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Kontrolle der Stimulierbarkeit und als Vergleich zur maximalen Stimulierbarkeit der PDH durch Insulin Inkubationen mit 1 mU/ml Insulin durchgeführt.

Abb. 12: Einfluß verschiedener Mengen verschiedener Phorbolster auf die Spontanaktivität der Fettzell-PDH



Herstellung der Fettzellen siehe Methodenteil. Die Zellen wurden in großen Polyethylenröhrchen 10 min inkubiert. Inkubationsansatz: 700 μ l 2,5% BSA-HEPES-Puffer, 300 μ l Zellen, 10 μ l Phorbolster-Verdünnung in Ethanol, Glukose in 1 mM Endkonzentration. Inkubationsstopp, Herstellung der Fettzellhomogenate, sowie Bestimmung der PDH-Aktivität siehe Methodenteil. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus mindestens 3 Versuchen.

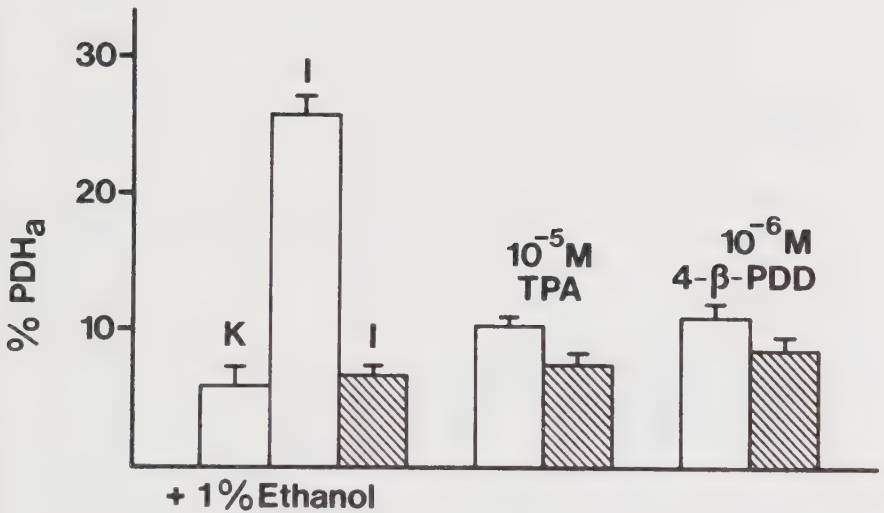
Die Phorbolester TPA und 4- β -PDD stimulieren die Fettzell-PDH, die anderen Phorbolester, 4- α -PDD, 4- β -Phorbol und PDEU stimulieren die PDH nicht. TPA stimuliert ab einer Konzentration von 10^{-7} M, 4- β -PDD stimuliert schon in einer Konzentration von 10^{-9} M. Während die Fettzell-PDH durch Insulin sich um das 3,7-fache stimulieren läßt (bei Versuchen mit 1% Ethanol im Inkubationsansatz; bei Kontrollen ohne Ethanol im Inkubationsansatz betrug der Stimulierungsfaktor durch Insulin 3,4), stimulieren TPA und 4- β -PDD die PDH nicht so stark. Bei TPA betrug der maximale Stimulierungsfaktor 2,5, bei 4- β -PDD ließ sich die PDH nur um das doppelte stimulieren.

3.4.2. Stimulierbarkeit der Fettzell-PDH durch 10 μ M TPA und 1 μ M 4- β -PDD in glukosefreiem Inkubationsmedium

Die Stimulierbarkeit der PDH ist glukoseabhängig (92, 121). Im folgenden Versuch wurde die Stimulierbarkeit der PDH durch Phorbolester in glukosefreiem Medium untersucht, um Anhaltspunkte für einen gemeinsamen Aktivierungsmechanismus der PDH durch Insulin und Phorbolester zu gewinnen.

Fettzellen wurden in glukosefreiem 2,5% BSA-HEPES-Puffer mit 10 μ M TPA; 1 μ M 4- β -PDD bzw. 1 mU/ml Insulin 10 min bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der Stimulierbarkeit der PDH wurden dieselben Inkubationen parallel mit der sonst üblichen Glukosekonzentration von 1 mM durchgeführt.

Abb. 13: Einfluß von glukosefreiem Inkubationsmedium auf die Aktivierbarkeit der Fettzell-PDH durch TPA, 4- β -PDD und Insulin



Inkubationsansatz: 700 μ l 2,5% BSA-HEPES-Puffer, 300 μ l Zellen und 10 μ l Zusatz von Ethanol, Phorbolestern oder Insulin in glukosefreien Ansätzen (▨). Ansätze mit Glukose entsprechend, jedoch mit 2,5% BSA-HEPES-Puffer mit 1,4 mM Glukose (□). Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 3 Versuchen. K = Kontrolle, I = Insulin.

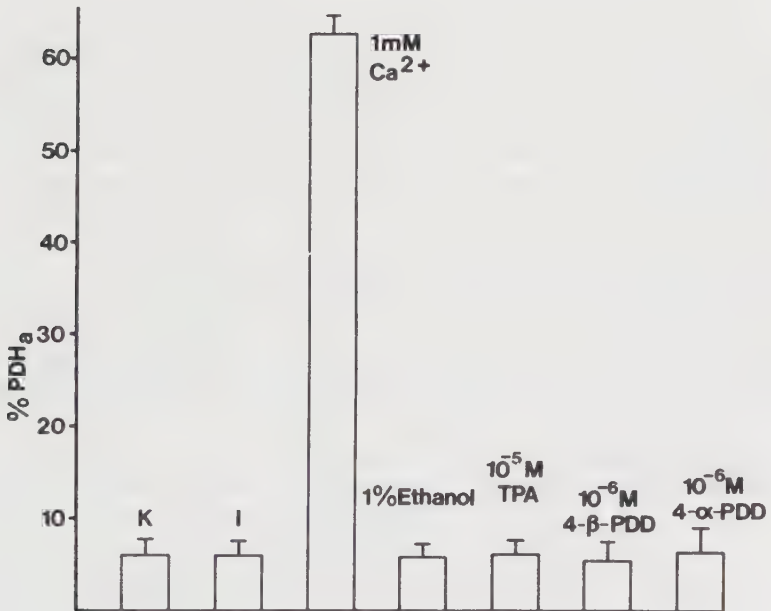
Bei den mit Glukose inkubierten Kontrollen findet man eine ca. 4-5-fache Stimulierung der PDH durch Insulin und eine Aktivierung der PDH um das doppelte durch die beiden Phorbolester, wie in den vorangegangenen Versuchen. In glukosefreiem Medium korrelieren die PDH-Aktivitäten gut mit der nur mit Ethanol inkubierten Kontrolle. Die Aktivierung der PDH findet in glukosefreiem Medium nicht statt.

3.4.3. Einfluß von Phorbolestern auf die PDH isolierter Fettzellmitochondrien

In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob Phorbolester den mitochondrialen PDH-Komplex direkt stimulieren, oder ob die Stimulierung indirekt, über einen an die intakte Zelle gebundenen Mechanismus vermittelt wird. Letztere Möglichkeit gliche der PDH-Aktivierung durch Insulin.

Mitochondrienisolierung und -Inkubation erfolgten, wie im Methodenteil beschrieben. Es wurden Inkubationen mit 10 μM TPA und 1 μM 4- β -PDD, die in diesen Konzentrationen die PDH isolierter Fettzellen aktivieren, durchgeführt. Außerdem wurden Inkubationen mit 1 μM 4- α -PDD, sowie mit 1 mU/ml Insulin und 1% Ethanol mitgeführt. Die Aktivierbarkeit der PDH wurde durch eine Inkubation mit einer aktivierenden Dosis von 1 mM Ca^{2+} überprüft.

Abb. 14: Einfluß von Phorbolestern auf die PDH isolierter Mitochondrien



Inkubationsansatz: 90 μl KCl-Medium, 10 μl Phorbolster-, Insulin- oder Ethanolverdünnung, 25 μl Mitochondriensuspension. Inkubation 9 min bei 25°C . Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 3 Versuchen. K = Kontrolle ohne Zusätze, I = Insulin.

Wie Insulin, haben auch 4- β -PDD und TPA keinen Einfluß auf die PDH isolierter Mitochondrien. Gegenüber der zusatzfreien Kontrolle besteht kein Unterschied. Auch 4- α -PDD und Ethanol haben keinen Einfluß auf die PDH-Aktivität. Die Mitochondrien waren intakt, ihre PDH ließ sich durch Ca^{2+} um das 10-fache stimulieren.

3.4.4. Versuche zur Stimulierbarkeit der Fettzell-PDH bei gleichzeitiger Inkubation der Fettzellen mit Insulin und stimulierenden Phorbolestern

Bei dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob sich die Fettzell-PDH bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Insulin und Phorbolestern mehr stimulieren läßt, als bei alleiniger Inkubation mit entweder Insulin oder Phorbolestern. Eine höhere Stimulierbarkeit der PDH durch gleichzeitige Inkubation mit Insulin und Phorbolestern würde auf einen unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus beider Substanzen schließen lassen. Es wurden die Phorbolster TPA und 4- β -PDD eingesetzt; TPA in einer Endkonzentration von 10 μ M, 4- β -PDD in einer Endkonzentration von 1 μ M (s. 3.4.1.). Kontrollinkubationen mit 1% Ethanol, sowie ethanol- und phorbolsterfreie Inkubationen wurden mitgeführt. Der Versuchsaufbau entsprach den Bedingungen in 3.4.1..

Tab. 9: Einfluß von Insulin und Phorbolestern auf die PDH-Spontanaktivität bei gleichzeitiger Gabe in das Inkubationsmedium der Fettzellen

Zusatz	1 mU/ml Insulin	% PDH _a	Stimulierungsfaktor
-	-	10,3 $\pm$ 0,5	
-	+	42,2 $\pm$ 2,5	4,1
1% Ethanol	-	11,4 $\pm$ 0,6	
"	+	46,9 $\pm$ 2,5	4,1
10 ⁻⁵ M TPA	-	23,1 $\pm$ 1,9	2,0
	+	53,8 $\pm$ 3,6	4,7
10 ⁻⁶ M 4- β -PDD	-	25,2 $\pm$ 2,9	2,2
	+	58,1 $\pm$ 3,4	5,1

Herstellung und Inkubation der Adipozyten siehe Methodenteil. Versuchsaufbau und- Durchführung wie in 3.4.1.. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 3 Versuchen.

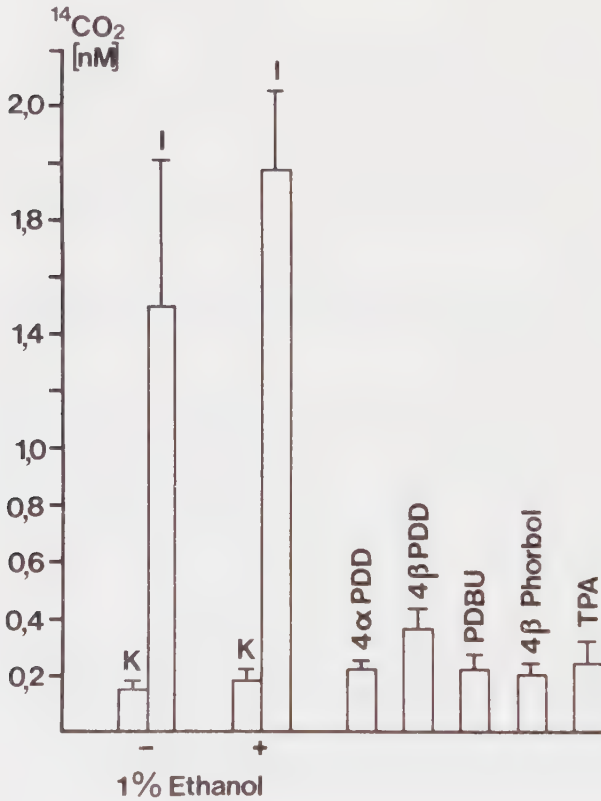
Bei gleichzeitiger Inkubation von Fettzellen mit Insulin und einem stimulierenden Phorbol ester ist eine etwas höhere Aktivierung der PDH zu beobachten, als mit alleiniger Inkubation mit Insulin. Die gleichzeitige Aktivierung der PDH mit Insulin und Phorbol estern entspricht jedoch nicht der Summe der Stimulierung durch Insulin und Phorbol ester; sie ist etwas niedriger.

3.4.5. Wirkung verschiedener Phorbol ester auf die Glukoseoxidation an Fettzellen

Nachdem Gemeinsamkeiten in der Aktivierbarkeit der PDH durch Insulin und Phorbol ester gefunden worden waren, sollte untersucht werden, ob Phorbol ester auch andere insulinähnliche Wirkungen an Fettzellen hervorrufen. Es wurde daher die Wirkung von Phorbol estern auf die Glukoseoxidation untersucht die durch Insulin stimulierbar ist (106).

Glukoseoxidation an Fettzellen wurde jeweils mit $1 \mu\text{M}$ 4- α -PDD, PDBU, 4- β -Phorbol und TPA durchgeführt. Da die Phorbol ester in Ethanol gelöst vorlagen, wurden Kontrollen ohne Phorbol ester, aber mit derselben Konzentration Ethanol im Inkubationsansatz (1%), durchgeführt. Als Kontrolle für die Stimulierbarkeit wurden ebenso Inkubationen mit 1 mU/ml Insulin mitgeführt.

Abb. 15: Wirkung von Phorbolestern auf die Glukoseoxidation



Inkubationsansätze wie im Methodenteil beschrieben. Inkubationszeit 15 min. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus 3 Versuchen. K = Kontrolle ohne Zusätze; I = Insulin

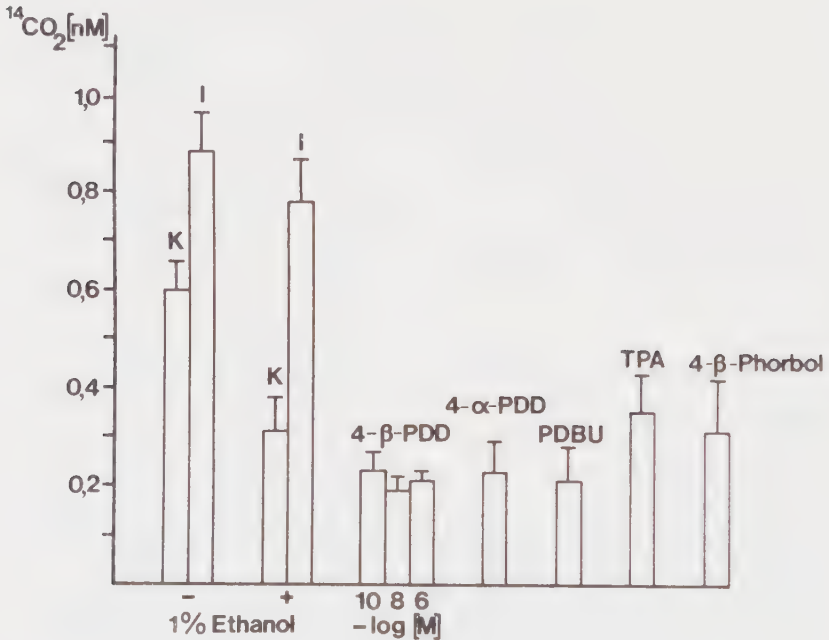
4- β -PDD stimuliert die Glukoseoxidation in einer Konzentration von 1 μ M im Inkubationsansatz, die anderen Phorbolester stimulieren die Glukoseoxidation in dieser Konzentration nicht. Die Stimulierung durch 4- β -PDD steigert die Glukoseoxidation soviel wie bei der PDH (s. 3.4.1.), ein deutlicher Effekt, der jedoch geringer als bei der Stimulierung der Glukoseoxidation durch Insulin ist, die etwa das 10-fache beträgt. Anwesenheit von Ethanol im Inkubationsansatz hatte keinen Einfluß auf die Glukoseoxidation. Skoglund et al. (109) hatten neben Stimulierung der Lipogenese auch Stimulierung der Glukoseoxidation an Fettzellen durch TPA, PDBU und 4- β -PDD zeigen können.

3.4.6. Wirkung verschiedener Phorbolester auf die Formiat-oxidation an Fettzellen

Durch Messung der Formiatoxidation erhält man Einsicht in die intrazelluläre Bildung von H_2O_2 , die durch Insulin stimuliert wird (79). H_2O_2 kann sämtliche Wirkungen des Insulins in der Zelle hervorrufen und wurde deshalb als möglicher second messenger des Insulins favorisiert (92). In diesen Versuchen sollte untersucht werden, ob Phorbolester Fettzellen ebenfalls zu vermehrter H_2O_2 -Produktion anregen, und die ähnlichen Wirkungen von Insulin und Phorbolestern an der Fettzelle auf diesen Mechanismus zurückführbar sind.

Es wurden dieselben Phorbolester in den selben Konzentrationen eingesetzt, wie bei der Glukoseoxidation. Zusätzlich wurden Konzentrationen von 0,1 nM und 10 nM 4- β -PDD mitgeführt. Die Kontrollen zur Stimulierbarkeit der Formiatoxidation durch Insulin und die Kontrollen zum Einfluß von Ethanol auf die Formiatoxidation wurden ebenso wie bei den Versuchen zur Glukoseoxidation angesetzt.

Abb. 16: Einfluß von Phorbolestern auf die Formiatoxidation



Inkubationsansätze wie im Methodenteil beschrieben. Ansätze mit Zellen als Dreifachwerte, zu jedem Ansatz wurden Leerwerte ohne Zellen als Doppelwerte mitgeführt, die dieselben Zusätze enthielten. Inkubationszeit 15 min. Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus mindestens 3 Versuchen. Für Kontrollen ohne Zusätze (K) und Insulin (I) $n=7$.

Keiner der Phorbolester stimuliert die Formiatoxidation in Konzentrationen, in denen PDH und Glukoseoxidation stimuliert werden. Der Stimulierungsfaktor der Formiatoxidation betrug für Inkubationen mit Insulin 1,5. Ethanol hat einen hemmenden Einfluß auf die Formiatoxidation, die Stimulierung durch Insulin wird jedoch nicht beeinträchtigt, so daß der fehlende Effekt der Phorbolester nicht auf deren Lösung in Ethanol zurückzuführen ist.

4. DISKUSSION

Insulinstimulierbare Phospholipase-C sollte aus in genügendem Maße zur Verfügung stehendem Gewebe isoliert und charakterisiert werden. Hierbei standen Erythrozytenghosts im Mittelpunkt des Interesses, nachdem von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits beschrieben wurde, daß Erythrozytenghosts Phospholipase-C-Aktivität zeigen (1, 2, 32, 33). In einer Reihe von Vorversuchen wurden die optimalen Testbedingungen für die Phospholipase-C der Erythrozytenghosts ermittelt.

Die optimale Desoxycholatkonzentration ist vergleichbar mit Befunden von Lenstra et al. (67) an der Thrombozyten-Phospholipase-C. Die leichte Maximumverschiebung zu niedrigeren Desoxycholatkonzentrationen am Erythrozytenghost läßt sich durch unterschiedlichen Membranaufbau der verschiedenen Zelltypen erklären. Das scharf begrenzte Aktivitätsmaximum kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß erst ab einer bestimmten Detergenzkonzentration die Membran so verändert wird, daß die Phospholipase-C mit dem angebotenen oder endogenen Substrat besser in Verbindung treten kann. Höhere Desoxycholatkonzentrationen könnten die Membranstruktur und die in sie eingebettete Phospholipase-C völlig zerstören.

Die Befunde zur Zeitabhängigkeit decken sich mit denen von Downes und Michell (32, 33), bei Inkubationszeiten über 10 min steigt die Phosphatkonzentration, beziehungsweise die Bildung von markiertem IP_3 nur noch unwesentlich an.

Bei Versuchen an Erythrozytenghosts zeigte sich, daß Insulin keinen Einfluß auf die Phospholipase-C-Aktivität hat. Eine Er-

klärung hierfür wäre die Tatsache, daß der Erythrozyt nur sehr wenige Insulinrezeptoren besitzt (45, 50). Grigorescu et al. fanden jedoch insulinstimulierte Autophosphorylierung des Rezeptors am Erythrozyten (41). Bisher wurden aber keine anderen Insulinwirkungen am Erythrozyten entdeckt. Es bestünde außerdem für den Erythrozyten keine physiologische Notwendigkeit, einen durch Insulin anabol regelbaren Stoffwechsel zu besitzen, da er keine Speicherkapazitäten für Energieträger wie Glykogen oder Triglyceride besitzt und seinen Energiebedarf mit der im Blut vorhandenen Glukose aufgrund fehlender Mitochondrien aus der anaeroben Glykolyse deckt.

Hinzu kommt, daß Phospholipase-C verschiedener Gewebe sicher verschiedene Eigenschaften besitzt. Low et al. (73) beschrieben verschiedene Formen der Phospholipase-C in Rattenherz, -Lunge und -Niere mit verschiedenen Molekulargewichten und Aktivitätsmaxima. Auch in einem Ausgangsgewebe kann es verschiedene Formen der Phospholipase-C geben (21, 72), die verschiedene Eigenschaften besitzen. Auffällig sind die von Typ zu Typ sehr unterschiedlichen Molekulargewichte, die zwischen 70 kD und 290 kD schwanken (116). Von daher ließen sich auch verschiedene Regulationsmechanismen der Phospholipase-C vermuten.

Die fehlende Stimulierbarkeit der Erythrozyten-Phospholipase-C durch Insulin ließ weitere Versuche, speziell ihre Isolierung, hinfällig erscheinen.

Bei Versuchen zum Mechanismus der Phospholipase-C-Stimulierung durch Insulin wurde zuerst untersucht, ob die Stimulierung eine stabile Veränderung am Enzym bewirkt, oder ob es sich hierbei um einen reversiblen Vorgang handelt. Es konnte gezeigt werden, daß die Stimulierung tatsächlich ein reversibler Prozeß ist, d. h.

nicht durch partielle Proteolyse des Enzyms verursacht wurde. Bemerkenswert ist hierbei, daß der zeitliche Verlauf des Aktivitätsrückgangs nach Stimulierung durch Insulin vergleichbar mit dem Wiederanstieg von PIP_2 in Leberzellen nach vasopressin-induziertem Abfall ist (59). Ein Mechanismus, der die Bedingungen einer schnellen Aktivierung und Inaktivierung erfüllen würde, wäre eine Umwandlung der Phospholipase-C durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Nachdem die β -Untereinheit des Insulinrezeptors mit ihrer tyrosinspezifischen Proteinkinaseaktivität (56, 57, 58) durch Bindung des Insulins am Rezeptor autokatalytisch phosphoryliert wird (75, 89) und, auf diese Weise aktiviert, andere Proteine phosphorylieren kann (28, 76), schien es denkbar, daß die Phospholipase-C durch die Rezeptorkinase phosphoryliert und somit aktiviert werden könnte. Die Reversibilität der Stimulierung könnte dann durch eine oder mehrere spezifische Phosphatasen erklärt werden, die die aktive Phospho-Phospholipase-C wieder in die inaktive Dephospho-Form zurückverwandeln. Die Inaktivierung wäre in diesem Modell nicht rezeptorabhängig. Häring et al. (42) fanden in diesem Zusammenhang, daß die Inaktivierung des Glukosetransports nach erfolgter Stimulierung ebenfalls rezeptorunabhängig geschieht; die Besetzung des Rezeptors mit Insulin hat auf die Inaktivierung keinen Einfluß.

Durch Einsatz verschiedener Phosphatasehemmer, wie Vanadat (113), Fluorid und EGTA, wurde diese Hypothese überprüft. Bei all diesen Versuchen ergab sich jedoch kein Anhaltspunkt für die Beteiligung einer Phosphoprotein-Phosphatase an der Inaktivierung der insulinaktivierten Phospholipase-C. Die Versuche mit Vanadat erlauben keine klaren Rückschlüsse, da sich herausstellte, daß Vanadat die Phospholipase-C hemmt. Nach Ergebnissen von Lindquist et al. (68) und Lopez et al. (71) stellt Na-Vanadat auch einen Hemmer für andere Enzyme, die Phosphatreste

durch Hydrolyse abspalten, so zum Beispiel für Ribonuklease und alkalische Phosphatase, dar. Jedoch ist die Rolle des Vanadats bei der Inaktivierung der Phospholipase-C nicht eindeutig: Ninfali et al. (85) beschrieben eine Aktivierung der Phosphatasen der Erythrozyten-Phosphoglyceratmutase durch Na-Vanadat. Combest und Johnson (24) entdeckten, daß die Adenylatcyclase in Adipozyten durch Vanadat stimuliert wird. Es bestehen demnach viele, nicht eindeutig geklärte Wirkungen des Vanadats auf verschiedene Enzyme, so daß sich eine gezielte Wirkung auf Phospholipase-C-assoziierte Phosphatasen nicht beobachten läßt.

Bei Zusatz von NaF und EGTA ließ sich kein Unterschied im zeitlichen Verlauf des Rückgangs der Phospholipase-C-Aktivität nach Insulinstimulierung zu den zusatzfreien Kontrollen beobachten. Der fehlende Einfluß der hier untersuchten Hemmstoffe auf die Reversibilität des Insulineffektes auf die Phospholipase-C schließt einen Aktivierungsmechanismus durch eine Phosphorylierung nicht mit Sicherheit aus.

Es wurde daher versucht, umgekehrt Phospholipase-C mit ATP zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Eine Aktivitätszunahme der Phospholipase-C konnte in den mit ATP versetzten Homogenaten jedoch nicht festgestellt werden. Um auszuschließen, daß die in den Homogenaten vorhandene cytosolische Phospholipase-C eventuell schon in der Phospho-Form vorliegt und durch ATP nicht weiter phosphoryliert werden kann, wurde der Versuch mit isolierten Fettzellmembranen wiederholt. Die Aktivierung der Phospholipase-C durch Insulin könnte nämlich auch nur die rezeptornähe, membranständige Phospholipase-C betreffen. Hierbei ließ sich jedoch auch keine Aktivitätssteigerung durch ATP beobachten. Diese Befunde decken sich nicht mit der kürzlich in unserem Labor gemachten Entdeckung, daß sich die Phospholipase-C in Plazenta-

membranen durch ATP stimulieren läßt (Urumow, unveröffentlicht). Das unterschiedliche Verhalten der Phospholipase-C in Fettzell- und Plazentamembranen wäre aber gut auf unterschiedliche Eigenschaften beider Enzyme zurückzuführen (73). Auch nach diesen Versuchen war die mögliche Rolle eines Phosphorylierungsprozesses nicht eindeutig geklärt.

Sicherlich brächte die Isolierung und Charakterisierung der Phospholipase-C weitere Hinweise auf ihre Regulation. Aufgrund der Tatsache, daß Rattenfettgewebe nicht in dem Maße und der Menge zur Verfügung steht, wie andere Ausgangsgewebe, aus denen bereits Phospholipase-C isoliert wurde (21, 43, 72, 104, 115, 116, 117), wurde auf die Isolierung der Phospholipase-C verzichtet.

Nach der Entdeckung der Aktivierung der Fettzell-PDH durch IP_3 (62) erhob sich die Frage, ob es sich dabei um ein unspezifisches Phänomen handelt. Es ist seit längerem bekannt, daß Insulin die PDH an Leberzellen nicht (90, 93) oder nur in ganz geringem Maße stimuliert (3). Der Einfluß von exogen zugeführtem IP_3 auf die Leberzell-PDH schien daher in dieser Frage weitere Aufschlüsse zu bringen. Tatsächlich zeigte IP_3 keinen Einfluß auf die PDH-Aktivität der isolierten Leberzelle, ebensowenig wie das von Irvine freundlicherweise zur Verfügung gestellte IP_2 . Leberzell-PDH ist genau wie die PDH der Fettzelle durch Ca^{2+} aktivierbar (46); wobei vermutlich Ca^{2+} die PDH-Phosphatase aktiviert, und die PDH dadurch von der inaktiven Phospho-Form in die aktive Dephospho-Form umgewandelt wird. Inkubationen von permeabilisierten Hepatozyten mit Ca^{2+} , die bei diesen Versuchen als Kontrolle für die Aktivierbarkeit der PDH mitgeführt wurden, bestätigen diesen Befund. Das Fehlen der IP_3 -abhängigen PDH-Aktivierung in Leberzellen ist schwer verständlich. So

spricht die Leber auf Vasopressin und andere Hormone prompt mit erhöhter IP_3 -Bildung und Calciummobilisierung aus cytosolischen Speichern an (26, 49). Interessanterweise führt Vasopressin auch zu einer Aktivierung der Leberzell-PDH (46,90). Der PI-Zyklus könnte also bei der Aktivierung der Leberzell-PDH durchaus eine Rolle spielen. Die fehlende Aktivierung durch Insulin und IP_3 ließe sich auch bei einer Beteiligung des PI-Zyklus an der Übermittlung des Hormonsignals erklären: das entweder nach Rezeptorstimulierung durch Insulin gebildete oder exogen zugeführte IP_3 wird durch IP_3 -Phosphatasen, die gleichzeitig durch Insulin aktiviert werden, rasch gespalten, wodurch eine Weiterleitung des Hormonsignals verhindert wird. Oder aber Leberzell-PDH stimulierende Hormone, z.B. Vasopressin, könnten auf noch ungeklärtem Wege die IP_3 -Phosphatasen hemmen, so einen IP_3 -Anstieg bewirken und über eine Ca^{2+} -Freisetzung die PDH aktivieren. Dagegen sprechen jedoch die Befunde von Joseph et al. (53), der bei exogener Zugabe von IP_3 zu permeabilisierten Hepatozyten einen deutlichen Ca^{2+} -Anstieg messen konnte. Das IP_3 wird also nicht so schnell abgebaut, daß es zu keiner intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung kommen könnte. Die fehlende Wirkung des IP_3 auf die Aktivierung der Leberzell-PDH kann in den Versuchen dieser Arbeit weder daran liegen, daß IP_3 nicht in die Zellen gelangte (was durch Messung des LDH-Ausstromes aus der Leberzelle überprüft wurde), noch an der fehlenden Stimulierbarkeit der Leberzell-PDH durch Ca^{2+} . Es bleibt deshalb schwierig, den fehlenden Effekt von IP_3 auf die Leberzell-PDH zu interpretieren. Eine Möglichkeit wäre, daß das Insulinsignal in der Leberzelle durch einen anderen Mechanismus zum mitochondrialen PDH-Komplex fortgeleitet wird, als in der Fettzelle. Einen Hinweis dafür liefern Versuche von Creba et al. (26). Hier führte Inkubation von Hepatozyten mit Insulin nicht zu einem Abfall von PIP_2 und PIP , der bei Inkubation der Zellen mit Vasopressin und Angiotensin beobachtet wurde.

Im letzten Teil der Arbeit wurde versucht, Zusammenhänge zwischen der Übertragung des Insulinsignals und der Stimulierung der Proteinkinase-C aufzudecken. Es wurde daher der Einfluß von Phorbolestern auf die PDH, die Glukoseoxidation und die Formiat-oxidation untersucht. Die Phorbolester sind als spezifische Aktivatoren der Proteinkinase-C bekannt. In der Vorliegenden Arbeit führten TPA und 4- β -PDD zu einer etwa zweifachen Stimulierung der PDH in Fettzellen, die durch eine Zunahme der PDH_a bei gleichbleibender Totalaktivität gekennzeichnet war. Die anderen Phorbolester zeigten an der PDH isolierter Fettzellen keinen Effekt. 4- β -PDD und TPA aktivieren die PDH in konzentrationsabhängiger Weise, jedoch nicht so stark wie Insulin. Ähnliche Beobachtungen machten Farese et al. (38), die PDH-Aktivierung in Myozyten fanden. Sie fanden außerdem insulinähnliche Effekte von TPA auf den Glukosetransport und die Aminosäureaufnahme. In darauffolgenden Experimenten wurde die stimulierende Wirkung der Phorbolester auf die PDH isolierter Fettzellen mit der des Insulins verglichen, um so Aufschluß über einen gemeinsamen Aktivierungsmechanismus zu gewinnen.

Frühere Untersuchungen dieses Laboratoriums hatten gezeigt, daß die Aktivierung der Fettzell-PDH durch Insulin von der Anwesenheit von Glukose abhängt (92, 121). Wie hier gefunden, trifft dies auch auf die Aktivierung des Enzyms durch Phorbolester zu. Dies könnte für einen gemeinsamen Aktivierungsmechanismus der PDH durch Insulin und Phorbolester sprechen. Die Rolle der Glukose in diesem Mechanismus ist nicht klar. Die Möglichkeit, daß Glukose als Vorstufe zur Bereitstellung von Inositphosphaten bei der PDH-Aktivierung durch Insulin eine Rolle spielen könnte (61), ist für die Phorbolester irrelevant.

Wie Insulin, zeigten auch Phorbolester keinen Effekt auf die PDH isolierter Mitochondrien. Der Aktivierungsmechanismus dieser Substanzen scheint demnach an das intakte Zellsystem gebunden zu sein. Hierbei könnte die cytosolische Proteinkinase-C eine Rolle spielen (87).

Bei gleichzeitiger Inkubation von Fettzellen mit Phorbolestern und Insulin ist eine Aktivierung der PDH zu beobachten, die höher ist, als die Aktivierung durch Insulin alleine, jedoch nicht so hoch, wie für einen voll additiven Effekt zu erwarten wäre. Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß sich die PDH erfahrungsgemäß nicht höher als bis zu einem Anteil von ca. 60% PDH_a aktivieren läßt. Jedoch führte gleichzeitige Zugabe von Insulin und Phorbolestern stets zu einer höheren PDH-Aktivität als Insulin alleine. Dies könnte vielleicht doch für einen unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus sprechen, Farese et al. (38) beobachteten dagegen keine zusätzliche PDH-Aktivierung mit Phorbolestern in Anwesenheit sättigender Insulinkonzentrationen, allerdings in Myozyten und nicht in Fettzellen.

Weiterhin wurde die Wirkung der Phorbolester auf die Glukoseoxidation und Formiatoxidation untersucht. Es wurde eine Stimulierung der Glukoseoxidation mit 4- β -PDD gefunden, allerdings weniger ausgeprägt, als bei Skoglund et al. (109), die außerdem eine Stimulierung durch TPA und PDBU fanden. Dieser Effekt ist jedoch viel kleiner als die Stimulierung durch Insulin.

Auf die Formiatoxidation hatten die Phorbolester keinen Einfluß im Sinne einer Stimulierung. Hierbei wird die Bildung von intrazellulärem H₂O₂ gemessen (79), das in der Zelle alle Insulinwirkungen hervorrufen kann und deshalb lange als möglicher

second messenger des Insulins diskutiert wurde (92). Die fehlende Stimulierung der Phorbol-ester auf die Formiatoxidation spricht also für einen anderen Wirkungsmechanismus dieser Substanzen. Welcher der beiden Mechanismen, vermehrte H_2O_2 -Bildung, oder Aktivierung der Proteinkinase-C durch den PI-Zyklus, für die Übertragung des Insulinsignals relevant ist, muß noch offen bleiben.

Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase-C bei der Übertragung des Insulinsignals liefern Arbeiten von Kirsch et al. (60), die eine Stimulierung des Glukosetransports durch Phorbol-ester im Rattenfettgewebe fanden. Gleichzeitig fanden sie eine Hemmung der Insulinbindung und vermuteten daher eine negative Rückkopplung durch Phorbol-ester beim Transfer des Insulinsignals auf Postrezeptorebene. Auch der Befund, daß Phorbol-ester zwar die Fettzell-PDH aktivieren, jedoch nicht so stark wie Insulin, ließe einen regelnden Einfluß der Proteinkinase-C auf die Überleitung des Insulinsignals vermuten.

Michell (83) schlug eine synergistische Übertragung von Hormonsignalen über beide Schenkel des IP_3 /DAG-Messengersystems vor. Proteinkinase-C könnte hierbei durch Rückkopplung regelnd in den Übertragungsweg eingreifen. Neben oben erwähnter direkter Rückkopplung auf die Hormonbindung an den Rezeptor ließen sich hier weitere Befunde einreihen: Phorbol-myristat-acetat führt zur Erhöhung von PIP_2 und PIP , die Phospholipase-C wird jedoch nicht stimuliert (44). Auch DeChaffoy DeCourcelles et al. (20) beobachteten eine vermehrte PIP_2 -Bildung nach Proteinkinase-C-Stimulierung. Eine positive Rückkopplung auf den ganzen PI-Zyklus und die Bereitstellung von PIP_2 für die Phospholipase-C könnte so durch DAG stattfinden. All diese Befunde sind jedoch nur lückenhaft und geben nur Hinweise auf eine mögliche Rolle

der Proteinkinase-C innerhalb der Signalübertragung von hormonellen Signalen über das IP_3 /DAG-System. Die genaue Funktion der Proteinkinase-C hierbei ist nach wie vor unklar.

Obwohl die Zusammenhänge zwischen der Übertragung des Insulinsignals und dem Phospholipidstoffwechsel auf verschiedenen Ebenen untersucht wurden, konnte bisher noch keine endgültige Klarheit über die Relevanz des von Berridge und Irvine (13) postulierten Signalübertragungssystems für Hormone mit IP_3 und DAG als second messengers gewonnen werden. Für eine Beteiligung dieses Mechanismus an der Übermittlung des Insulinsignals spricht die kurzzeitige, reversible Stimulierung der Phospholipase-C durch Insulin, die PDH-Aktivierung durch IP_3 und Phorbol ester, sowie die Stimulierung der Glukoseoxidation durch Phorbol ester, die Gemeinsamkeiten mit der Wirkung von Insulin zeigen. Nicht eindeutig interpretierbar ist die fehlende Wirkung von IP_3 auf die PDH-Aktivität der Leberzelle, die ebenfalls bei Insulin beobachtet wird. Der Mechanismus der Phospholipase-C-Stimulierung durch Insulin ist weiterhin nicht klar. Ein Phosphorylierungsprozeß, der sich für die Aktivierung vermuten läßt, ließ sich nicht nachweisen, jedoch auch nicht mit Sicherheit ausschließen.

Um eine Beteiligung des IP_3 /DAG-Messengersystems an der Transduktion des Insulinsignals sichern zu können, ist ein großer technischer, finanzieller und zeitlicher Aufwand nötig, der den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte. Andere Hypothesen zum Übertragungsmechanismus des Insulinsignals müssen außerdem im Auge behalten und studiert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, daß die Übertragung des Insulinsignals vom Rezeptor in die Zelle durch Metabolite des Phospholipidstoffwechsels stattfindet. Berridge und Irvine (13) lieferten ein Modell eines second messenger Systems, in dem durch die Spaltung von PIP_2 durch die Phospholipase-C zwei Spaltprodukte entstehen, IP_3 und DAG, die eventuell die Rolle der Botenstoffe übernehmen könnten. IP_3 setzt aus intrazellulären Speichern Ca^{2+} frei, wodurch zahlreiche Enzyme in ihrer Aktivität beeinflusst werden. DAG aktiviert zusammen mit Ca^{2+} Proteinkinase-C, die ihrerseits regelnd in den Zellstoffwechsel eingreift.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, weitere Zusammenhänge zwischen dem Phosphatidylinositstoffwechsel und der Übertragung des Insulinsignals aufzudecken. Dabei wurden drei verschiedene Schwerpunkte gesetzt:

- 1.: im ersten Teil der Arbeit wird die vermutete Schlüsselrolle der Phospholipase-C in diesem Signalübertragungssystem näher untersucht. Nachdem in Fettzellen eine Stimulierung der Phospholipase-C durch Insulin beobachtet wurde (61), wurde die Phospholipase-C an Erythrozytenghosts untersucht, wobei hier besonderes Interesse der ebenfalls möglichen Stimulierbarkeit durch Insulin galt. Im Falle der Stimulierbarkeit durch Insulin sollte das Enzym isoliert und auf den möglichen Stimulierungsmechanismus hin untersucht werden. Die fehlende Stimulierbarkeit der Phospholipase-C der Erythrozytenghosts lenkte die Versuche zur Aufklärung des Stimulierungsmechanismus dieses Enzyms wieder auf Beobachtungen

der Phospholipase-C an Fettzellen. Im folgenden wurde der Schwerpunkt der Versuche auf einen möglichen Phosphorylierungsprozeß, der bei der Stimulierung der Phospholipase-C eine Rolle spielen könnte, gesetzt. Eine wichtige Beobachtung zeigte, daß die Aktivierung der Phospholipase-C durch Insulin keine stabile Veränderung des Enzyms bewirkt, sondern reversibel ist. Ein Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsmechanismus ließ sich jedoch mit den durchgeführten Versuchen nicht eindeutig nachweisen.

- 2.: Ein gutes System zur Untersuchung der second messenger-Hypothesen des Insulins stellt der durch Insulin aktivierbare mitochondriale PDH-Komplex des Fettgewebes dar. Während in früheren Arbeiten eine Aktivierung der Fettzell-PDH durch IP_3 gezeigt werden konnte (62), erwies sich in dieser Arbeit IP_3 auf die PDH der Leberzelle als unwirksam. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß in der Leber auch Insulin keine Wirkung auf die PDH besitzt.
- 3.: Der dritte Teil der Arbeit befaßt sich mit der Rolle des DAG als potentieller second messenger des Insulins. Nachdem Phorbolester DAG als Aktivatoren der Proteinkinase-C ersetzen können, lag es nahe, Phorbolester an Fettzellen hinsichtlich insulinähnlicher Wirkungen zu untersuchen. Zuerst wurde der Einfluß von Phorbolestern auf die PDH untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Phorbolester TPA und 4- β -PDD die PDH in konzentrationsabhängiger Weise aktivieren, allerdings nicht so stark wie Insulin. Einige Charakteristika der Aktivierung der PDH haben Insulin und Phorbolester gemeinsam: die Aktivierung findet nur an Zellen, nicht aber an isolierten Mitochondrien statt. In beiden Fällen ist zur Aktivierung Glukose im Inkubationsmedium not-

wendig. Hingegen führt gleichzeitige Inkubation mit Phorbol-
stern und Insulin zu einer höheren Aktivierung als durch In-
sulin oder Phorbol-ester alleine.

Ferner konnte eine Stimulierung der Glukoseoxidation durch
4- β -PDD festgestellt werden. Auch hier war die Stimulierung
nicht so hoch wie durch Insulin. Auf die Formiatoxidation,
die durch Insulin stimuliert wird, hat keiner der Phorbol-
ester einen Einfluß. Dies und die additive Wirkung der
Phorbol-ester über die maximale Insulindosis hinaus würde
eher gegen einen gemeinsamen Signalübertragungsmechanismus
für Insulin und Phorbol-ester sprechen.

Obwohl der endgültige Beweis für die Beteiligung des Phosphati-
dylinositstoffwechsels in der Übertragung des Insulinsignals in
die Fettzelle noch aussteht, liefern die Ergebnisse dieser Ar-
beit weitere Hinweise darauf, daß IP_3 und DAG eine Rolle als
second messenger des Insulins spielen könnten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allan, D. & Michell, R.H., Biochim. Biophys. Acta 508, 277-286 (1978)
2. Allan, D., Cell Calcium 3, 451-465 (1982)
3. Assimacopoulos-Jeannet, F., McCormack, J.G., Prentki, M., Jeanreaud, B. & Denton, R.M., Biochim. Biophys. Acta 717, 86-90 (1982)
4. Banting, F.G. & Best, C.H., J. Lab. Clin. Med. 7, 251-266 (1922)
5. Barrit, G.J. & Whiting, J.A., Biochem. J. 210, 115-119 (1983)
6. Beaven, M.A., Moore, J.P., Smith, G.A., Hesketh, T.R. & Metcalfe, J.C., J. Biol. Chem. 259, 7137-7142 (1984)
7. Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. & Pfeleiderer, G., Z. Naturforsch. 8 B, 555-577 (1953)
8. Belsham, G.J., Denton, R.M. & Tanner, M.J.A., Biochem. J. 192, 457-467 (1980)
9. Bergmeyer, H.U. & Bernt, E., In: "Methoden der enzymatischen Analyse", Ed.: H.U. Bergmeyer, Vlg. Chemie, Weinheim, Bergstraße, Band 1, 533-538 (1970)
10. Berridge, M.J., Mol. Cell. Endocrin. 24, 115-140 (1981)
11. Berridge, M.J., Biochem. J. 212, 849-858 (1983)
12. Berridge, M.J., Biochem. J. 220, 345-360 (1984)
13. Berridge, M.J. & Irvine, R.F., Nature 312, 315-321 (1984)
14. Berry, M.N. & Friend, D.S., J. Cell. Biol. 43, 506-520 (1969)
15. Biden, T.J., Prentki, M., Irvine, R.F., Berridge, M.J. & Wollheim, C.B., Biochem. J. 223, 467-475 (1984)
16. Blecher, M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 202-209 (1965)

17. Burgess, G.M., Godfrey, P.P., McKinney, J.S., Berridge, M.J., Irvine, R.F. & Putney Jr, J.W., *Nature* 309, 63-67 (1984)
18. Burns, C.P. & Rozengurt, E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 931-938 (1983)
19. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. & Nishizuka, Y., *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851 (1982)
20. DeChaffoy-DeCourcelles, D., Roevens, P. & Van Belle, H., *FEBS Lett.* 173, 389-393 (1984)
21. Chau, L.J. & Tai, H.H., *Biochim. Biophys. Acta* 713, 344-351 (1982)
22. Christiansen, R., Borrebaeck, B. & Bremer, J., *FEBS Lett.* 62, 313-317 (1976)
23. Cockcroft, S. & Gomperts, B.D., *Nature* 314, 534-536 (1985)
24. Combest, W.L. & Johnson, R.A., *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 916-927 (1983)
25. Craven, P.A. & DeRubertis, F.R., *J. Biol. Chem.* 258, 4814-4823 (1983)
26. Creba, J.A., Downes, C.P., Hawkins, P.T., Brewster, G., Michell, R.H. & Kirk, C.J., *Biochem. J.* 212, 733-747 (1983)
27. Czech, M.P., *Ann. Rev. Biochem.* 46, 359-384 (1977)
28. Czech, M.P., Yu, K. & Seals, J.R., *Diabetes Care*, Vol. 7, 8-16 (1984)
29. Denton, R.M., Coore, H.G., Martin, B.R. & Randle, P.J., *Nature* 231, 115-116 (1971)
30. Denton, R.M., Randle, P.J., Bridges, B.J., Cooper, R.H., Kerbey, A.L., Pask, H.T., Severson, D.L., Stansbie, D. & Whitehouse, S., *Mol. Cell. Biochem.* 9, 27-53 (1975)
31. Denton, R.M., Brownsey, R.W. & Belsham, G.J., *Diabetologia* 21, 347-362 (1981)
32. Downes, C.P. & Michell, R.H., *Biochem. J.* 198, 133-140 (1981)

33. Downes, C.P. & Michell, R.H., *Biochem. J.* 202, 53-58 (1982)
34. Elsbach, P. & Rizack, M.A., *Biochim. Biophys. Acta* 198, 82-87 (1970)
35. Farese, R.V., Larson, R.E. & Sabir, M.A., *J. Biol. Chem.* 257, 4042-4045 (1982)
36. Farese, R.V., *Metabolism* 32, 628-641 (1983)
37. Farese, R.V., *Mol. Cell. Endocrin.* 35, 1-14 (1984)
38. Farese, R.V., Standaert, M.L., Barnes, D.E., Davis, J.S. & Pollet, J.R., *Endocrinology* 116, 2650-2655 (1985)
39. Freedholm, B.B., Mollby, R., Anderson, P., Malmquist, T. & Smith, C.J., *Acta Pharmacol. Toxicol.* 42, 23-34 (1978)
40. Gomperts, B.D., *Nature* 306, 64-66 (1983)
41. Grigorescu, F., Whit, M.F. & Kahn, C.R., *J. Biol. Chem.* 258, 13708-13716 (1983)
42. Häring, H.U., Biermann, E. & Kemmler, W., *Am. J. Physiol.* 242 (Endocrinol. Metab. 5), E 234-E 240 (1982)
43. Hakata, H., Kambayashi, J. & Kosaki, G., *Biochem. (Tokyo)* 92, 929-935 (1982)
44. Halenda, S.P. & Feinstein, M.B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 507-513 (1984)
45. Hara, H., Hidaka, H., Kosmakos, F.C., Mott, D.M., Wasquez, B., Howard, B.Y. & Bennet, P.H., *J. Clin. Endocrin. Metab.* 52, 17-22 (1981)
46. Hems, D.A., McCormack, J.G. & Denton, R.M., *Biochem. J.* 176, 627-629 (1978)
47. Hokin, M.R. & Hokin, L.E., *J. Biol. Chem.* 203, 967-977 (1953)
48. Honeyman, T.W., Strohsnitter, W., Scheid, C.R. & Schimmel, J., *Biochem. J.* 212, 489-498 (1983)
49. Hughes, B.P., Rye, K.A., Pickford, L.B., Barrit, G.J. & Chalmers, A.H., *Biochem. J.* 222, 535-540 (1984)

50. Im, J.H., Meezan, E., Rackley, C.E. & Kim, H.D., J. Biol. Chem. 258, 5021-5026 (1983)
51. Irvine, R.F., Letcher, A.J. & Dawson, R.M.C., Biochem. J. 218, 177-185 (1984)
52. Jarret, L. & Seals, J.R., Science 206, 1407-1408 (1979)
53. Joseph, S.K., Thomas, A.P., Williams, J.R., Irvine, R.F. & Williamson, J.R., J. Biol. Chem. 259, 3077-3081 (1984)
54. Jungas, R.L., Metabolism 20, 43-53 (1971)
55. Kaibuchi, K., Takai, Y. & Nishizuka, Y., J. Biol. Chem. 256, 7146-7149 (1981)
56. Kasuga, M., Karlsson, F.A. & Kahn, C.R., Science 215, 185-187 (1982)
57. Kasuga, M., Zick, Y., Blithe, D.L., Crettaz, M. & Kahn, R., Nature 298, 667-669 (1982)
58. Kasuga, M., Fujita-Yamaguchi, Y., Blithe, D.L. & Kahn, C.R., Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 2137-2141 (1983)
59. Kirk, C.J., Creba, J.A., Downes, C.P. & Michell, R.H., Biochem. Soc. Trans. 9, 377-379 (1981)
60. Kirsch, D., Obermaier, B. & Häring, H.U., Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 824-832 (1985)
61. Köpfer-Hobelsberger, B. & Wieland, O.H., Mol. Cell. Endocrin. 36, 123-129 (1984)
62. Köpfer-Hobelsberger, B. & Wieland, O.H., FEBS Lett. 176, 411-413 (1984)
63. Krebs, H.A. & Henseleit, K., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 210, 33-66 (1932)
64. Lagast, H., Pozzan, T., Waldvogel, F.A. & Lew, P.D., J. Clin. Invest. 73, 878-883 (1984)
65. Larner, J., Galasko, G., Cheng, K., DePaoli-Roach, A.A., Huang, L., Daggy, P. & Kellog, J., Science 206, 1408-1410 (1979)
66. Larner, J., J. Cycl. Nucl. Res. 8 (5), 289-296 (1982)

67. Lenstra, R., Mauco, G., Chap, H. & Douste-Blazy. L.,
Biochim. Biophys. Acta 792, 199-206 (1984)
68. Lindquist, R.N., Lynn, J.L. & Lienhard, G.E., J. Am.
Chem. Soc. 95, 8762-8768 (1973)
69. Litosh, I., Lee, H.S. & Fain, J.N., Am. J. Physiol. 246,
(Cell Physiol. 15), C 141-C 147 (1984)
70. Löffler, G., Bard, S. & Wieland, O.H., FEBS Lett. 60,
269-274 (1975)
71. Lopez, V., Stevens, T. & Lindquist, R.N., Arch. Biochem.
Biophys. 175, 31-38 (1976)
72. Low, M.G. & Weglicki, W.B., Biochem. J. 215, 325-334
(1983)
73. Low, M.G., Carroll, R.G. & Weglicki, W.B., Biochem. J.
221, 813-820 (1984)
74. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.,
J. Biol. Chem. 193, 265-275
75. Machicao, F., Urumow, T. & Wieland, O.H., FEBS Lett. 149,
96-100 (1982)
76. Machicao, F., Urumow, T. & Wieland, O.H., FEBS Lett. 163,
76-80 (1983)
77. Machicao, F. & Wieland, O.H., FEBS Lett. 175, 113-116
(1984)
78. Marx, L.J., Science 224, 271-274 (1984)
79. May, J.M. & DeHaen, C., J. Biol. Chem. 254, 2214-2220
(1979)
80. Michell, R.H., Biochim. Biophys. Acta 415, 81-147 (1975)
81. Michell, R.H., Trends Biochem. Sci. 4, 128-131 (1979)
82. Michell, R.H., Cell Calcium 3, 285-294 (1982)
83. Michell, R.H., Trends Biochem. Sci. 8, 263-265 (1983)
84. Michell, R.H., Trends Biochem. Sci. 9, 3-4 (1984)

85. Ninfali, P., Accorsi, A., Fazi, A., Palma, F. & Fornaini, G., Arch. Biochem. Biophys. 226, 441-447 (1983)
86. Nishizuka, Y., Trends Biochem. Sci. 8, 13-16 (1983)
87. Nishizuka, Y., Nature 308, 693-698 (1984)
88. Nishizuka, Y., Trends Biochem. Sci. 9, 163-166 (1984)
89. Obberghen, E.v. & Kowalski, A., FEBS Lett. 143, 179-182 (1982)
90. Oviasu, O.A. & Whitton, P.D., Biochem. J. 224, 181-186 (1984)
91. Paetcke-Brunner, I., Schön, H. & Wieland, O.H., FEBS Lett. 93, 307-311 (1978)
92. Paetcke-Brunner, I. & Wieland, O.H., FEBS Lett. 122, 29-32 (1980)
93. Patzelt, C., Löffler, G. & Wieland, O.H., Eur. J. Biochem. 33, 117-122 (1973)
94. Rodbell, M., J. Biol. Chem. 239, 375-380 (1964)
95. Rodbell, M., J. Biol. Chem. 241, 130-139 (1966)
96. Rodbell, M. & Jones, A.B., J. Biol. Chem. 241, 140-142 (1966)
97. Rosenthal, J.W. & Fain, J.N., J. Biol. Chem. 246, 5888-5895 (1971)
98. Rosoff, P.M., Stein, L.F. & Chantley, L.C., J. Biol. Chem. 259, 7056-7060 (1984)
99. Ross, B.D., Clarendon Press, Oxford, "Perfusion Techniques in Biochemistry" (1972)
100. Rouser, G., Fleischer, S. & Yamamoto, A., Lipids 5, 494-496 (1970)
101. Sanger, F., Science 129, 1340-1344 (1959)
102. Seals, J.R. & Czech, M.P., J. Biol. Chem. 255, 6529-6531 (1980)

103. Seals, J.R. & Jarret, L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 77-81 (1980)
104. Shen, R.F. & Tai, H.H., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 40, 1629 (1981)
105. Sica, U. & Cuatrecasas, P., Biochemistry 12, 2282-2291 (1973)
106. Siess, E., Teinzer, A. & Wieland, O.H., Diabetologia 1, 201-207 (1965)
107. Siess, E.A. & Wieland, O.H., Eur. J. Biochem. 26, 96-105 (1972)
108. Siess, E.A., Brocks, D.G., Lattke, H.K. & Wieland, O.H., Biochem. J. 166, 225-235 (1977)
109. Skoglund, G., Hansson, A. & Ingelman-Sundberg, M., Eur. J. Biochem. 148, 407-412 (1985)
110. Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J. & Schulz, I., Nature 306, 67-69 (1983)
111. Sutherland, E.W., Angew. Chemie 84, 1117-1125 (1972)
112. Sutherland, E.W. & Rall, T.W., J. Biol. Chem. 232, 1077-1091 (1958)
113. Swarup, G., Cohen, S. & Garbers, D.L., J. Biol. Chem. 256, 8197-8201 (1981)
114. Tabor, H., Mehler, A.H. & Stadtman, E.R., J. Biol. Chem. 204, 127-138 (1953)
115. Tai, L.L. & Tai, H.H., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 40, 347 (1981)
116. Takenawa, T. & Nagai, Y., J. Biol. Chem. 256, 6769-6775 (1981)
117. Thomas, A.P., Alexander, J. & Williamson, J.R., J. Biol. Chem. 259, 5574-5584 (1984)
118. Thompson, W. & Dawson, R.M.C., Biochem. J. 91, 233 (1964)

- 119. DeTorrentegui, G. & Berthet, J., *Biochim. Biophys. Acta* 116, 477-481 (1966)
- 120. Weiss, L., Löffler, G., Schirmann, A. & Wieland, O.H., *FEBS Lett.* 15, 229-231 (1971)
- 121. Weiss, L., Löffler, G. & Wieland, O.H., *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 363-377 (1974)
- 122. Wieland, O.H., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 96, 124-170 (1983)
- 123. Winegrad, A.I. & Renold, A.E., *J. Biol. Chem.* 233, 267-272 (1958)

LEBENS LAUF

1. 10. 1957: in Karlsruhe geboren als Sohn des Kunsthistorikers Dr. Klaus Gallwitz und seiner Frau, der Biologin Dr. Esther Gallwitz, geborene Uebelmesser.
- 1964 - 1967: Besuch der Grundschule in Karlsruhe und Baden-Baden.
- 1967 - 1974: Besuch des humanistischen Gymnasiums Hohenbaden in Baden-Baden.
- 1974 - 1975: einjähriger Aufenthalt in San Jose, California, U.S.A. als Austauschschüler.
- 1975 - 1977: Besuch des Goethe-Gymnasiums in Frankfurt am Main, Abitur im Sommer 1977.
- 1977 - 1979: zum Wintersemester Beginn des Medizinstudiums an der Universität Essen-Gesamthochschule. Physikum im Sommer 1979.
- 1979 - 1981: klinisches Studium an der Freien Universität Berlin. 1980 endgültige Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes.
- 1981 - 1982: Einjähriger Studienaufenthalt in England an Lehrkrankenhäusern der St. Mary's Hospital Medical School, London und der Welsh University Cardiff, Swansea, Wales.
- 1982 - 1984: Studium und Praktisches Jahr an der Technischen Universität München. Approbation im April 1984.
- 1984 - 1985: seit Mai wissenschaftlicher Angestellter und Doktorand bei Prof. Dr. O. H. Wieland am Institut für Diabetesforschung in München.

Seit November 1985 arbeite ich an der Universitätsklinik Göttingen, Abteilung Gastroenterologie und Stoffwechsel.

